

**Vergleichende immunologische Untersuchungen
an Blasenflüssigkeit und Serum**

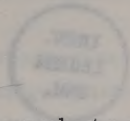
Karola Gebhart

1974

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. O. Braun - Falco

Vergleichende immunologische Untersuchungen
an Blasenflüssigkeit und Serum

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Karola Gebhart
aus
Großkarolinenfeld
1974

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Marghescu
2. Berichterstatter: Professor Dr. O. Braun - Falco
Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.1974



GLIEDERUNG

	Seite
A. Einleitung	1
1. Thematische Einführung	1
2. Die Erfrierungsblase	1
3. Ausgewählte Untersuchungsmethoden	2
B. Theoretische Grundlagen	3
1. Grundlagen der Elektrophorese	3
a) Bedeutung	3
b) Definition	3
c) Anfänge der Elektrophorese	3
d) Prinzip der Elektrophorese	4
e) Entwicklung der Elektrophorese	5
α) freie Elektrophorese	5
β) Träger-Elektrophorese	5
2. Besondere Elektrophorese-Formen	8
3. Die Methoden quantitativer Proteinbestimmung	14
C. Experimenteller Teil	15
1. Material	15
2. Methoden	15
a) Die Immunelektrophorese	15
b) Die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese	20
c) Die einfache radiale Immundiffusion	24
3. Ergebnisse	26
a) Zur Immunelektrophorese	26
b) Zur Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese	30
c) Zur einfachen radialen Immundiffusion	34
D. Diskussion	38
E. Zusammenfassung	45
F. Literaturverzeichnis	46
Lebenslauf	

A.) EINLEITUNG

1. Thematische Einführung

Der Austritt von Blutserum aus den Gefäßen der Haut in das Corium und von dort aus in die Epidermis ist bei zahlreichen dermatologischen Affektionen zu beobachten.

Als klinisch sichtbare Zeichen dieser "Exoseroe" werden an der Hautoberfläche vor allem Quaddeln, Bläschen und Blasen beobachtet.

Um in den Interzellularraum der Epidermis zu gelangen, muß das Serum 2 "Schrannen" überwinden: Die Gefäßwand und die Basalmembran an der dermo-epidermalen Grenze. Hierbei ist die Frage von grundsätzlicher Bedeutung, ob das Serum beim Passieren dieser "Schrannen" nur diffundiert, oder auch filtriert wird.

Zur Klärung dieser Frage wurden qualitative und quantitative Untersuchungen von Serumproteinen im Blaseninhalt und im Blutserum von Patienten am Modell der Erfrierungsblase angestellt.

2. Die Erfrierungsblase

Blasen und Bläschen entstehen durch eine Trennung des Zusammenhanges der Epidermiszellen (21). Der Aufbau der Epidermis beginnt mit dem Stratum basale, einer einreihigen Schicht zylindrischer Zellen, die dem wellenförmigen Papillenverlauf des angrenzenden Coriums folgt. Darauf baut sich aus spindelförmigen Zellen das Stratum spinosum auf. Eine ähnliche, aber dünnere Schicht, bildet das Stratum granulosum, an das sich bei der verhornten Epidermis an Handflächen und Fußsohlen das Stratum lucidum und zuletzt die kernlosen Zellen des Stratum corneum anschließen.

Dieser Schichtenaufbau läßt eine grobe Einteilung der Blasen und Bläschen nach morphologischen Gesichtspunkten zu.

Zunächst gibt es aber verschiedene Anschauungen darüber, wie Blase (bulla) und Bläschen (vesicula) voneinander abgegrenzt werden sollen: "Die Bezeichnung Bläschen und Blase bezieht sich nicht auf die Größe der Einzeleffloreszenzen. Vielmehr wird nach der Lehre von den Hautblüten die vesicula als intraepidermale und die bulla als subcorneale oder subepidermale Hohlraumbildung definiert." (21) Eine andere Einteilung wird von STEIGLEDER (65) vertreten: "Die Blase unterschei-

det sich rein klinisch durch ihre Größe vom Bläschen."

Intraepidermale Hohlrumbildungen können auf Grund verschiedener Gewebsveränderungen entstehen. Der Prototyp der schweren entzündlichen Veränderungen in der Epidermis ist das spongiotische Bläschen, das mit der Spongiose, einer umschriebenen Erweiterung der Interzellularräume der Stachelzellschicht und mit einem intrazellulären Ödem beginnt, bis die Zellen schließlich ihren Zusammenhang verlieren und das eigentliche Bläschen entstanden ist (65).

Bei durch Akantholyse bedingten Blasen dagegen steht die Lösung der Brücken zwischen den Epithelzellen im Vordergrund. Die erste Schädigung ist dabei an den Tonofibrillen zu vermuten, die die Zellen zusammenhalten (65). Während bei der Akantholyse daher die Tonofibrillen vermindert sind, werden sie bei einer anderen Blasenart, der Spalt- bzw. Rißblase nur zusammengepreßt (45).

Die einfache Spaltung der Epidermis entsteht durch ein interstitielles Ödem, z.B. nach einer umschriebenen, extrem intensiven Kälteeinwirkung. Bei der örtlichen Erfrierung zweiten Grades setzt nach Auftauung die Durchblutung wieder ein und führt infolge Dilatation der Endstrombahn über eine Blutstase zu starker Anreicherung von Gewebsflüssigkeit, was in einer Anschwellung der Haut sichtbar wird (Kälte-Ödem). Die Epidermis zeigt dabei morphologisch keine wesentlichen Schädigungen. Der Blaseninhalt ist meist serös, kann aber durch Arrosion von Kapillaren hämorrhagisch sein (75).

Diese auf Grund örtlicher Erfrierungen entstehenden Blasen boten sich unseren Versuchen als Arbeitsgrundlage an.

3. Ausgewählte Untersuchungsmethoden

Um die Fragestellung experimentell lösen zu können, wurden verschiedene elektrophoretische und immunologische Methoden auf ihren spezifischen Aussagewert geprüft, wobei sich zur immunologischen Differenzierung und zum Vergleich mit Serumproteinen die Immunoelktrophorese besonders gut eignete, während für weitergehende Auftrennungen des Proteingemisches die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese den Vorzug bekam. Die quantitativen Bestimmungen ließen sich am besten mit der radialen Immundiffusion nach MANCINI (38) durchführen.

B.) THEORETISCHE GRUNDLAGEN

1. Grundlagen der Elektrophorese

a) Bedeutung:

Auf der Suche nach Möglichkeiten, Proteingemische aufzutrennen, führt die Entwicklung von den einfacheren Methoden wie das fraktionierte Aussalzen zu den komplizierteren, die zwar aufwendigerer Apparaturen bedürfen, dafür aber bessere Ergebnisse liefern. Immer noch Bedeutung hat die Ultrazentrifugation, die eine Differenzierung einzelner Proteinfractionen anhand der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit im Schwerfeld erlaubt.

Die Chromatographie trennt die Proteine auf Grund ihrer unterschiedlichen Anreicherung an Phasengrenzflächen (Adsorption).

Im Rahmen der klinischen Diagnostik kommt heute jedoch, vor allen anderen Trennungsmethoden, der Elektrophorese die größte Bedeutung zu.

b) Definition

Bei der Elektrophorese wirkt ein elektrisches Feld auf die in einer Lösung vorhandenen Ionen, die dann transportiert werden. Diesen Transport nennt man bei kleinen Ionen Iontophorese, bei den großen, kolloidalen Ionen (wie Proteine) Elektrophorese.

c) Anfänge der Elektrophorese

Den Begriff der Elektrophorese führten HARDY und MICHAELIS (17, 42) ein, nachdem sie den gleichen Vorgang eine Zeitlang als Kataphorese bezeichnet hatten. Die ersten grundlegenden Beobachtungen hierüber wurden jedoch schon im vorigen Jahrhundert gemacht. Nachdem KOHLRAUSCH (29) gezeigt hatte, daß in einer homogenen Leitlösung der Durchgang elektrischen Stromes keine Änderung in ihrer Zusammensetzung hervorzurufen vermochte, konnten HITTORF 1853 und LODGE 1886 (22, 37) bereits folgern, daß die in ihren Versuchen hervorgerufenen Konzentrationsverschiebungen in Flüssigkeiten mit angelegten Elektroden und fließendem Strom auf die Anwesenheit von Ionen beruhten.

d) Prinzip der Elektrophorese

Proteine sind polyvalente Ionen, d.h., sie haben in ihren Seitenketten basische und saure Gruppen, die, je nach pH-Wert ihrer Lösung, geladen oder ungeladen sind. Bei einem für jedes Protein charakteristischen pH-Wert, dem isoelektrischen Punkt, heben sich die negativen und positiven Ladungen der Seitenketten gegenseitig auf, das Protein erscheint nach außen ungeladen. Dieser isoelektrische Punkt liegt bei den meisten Proteinen zwischen pH 2, 7 und 7, 3.

Verschiebt sich der pH-Wert vom isoelektrischen Punkt ins Alkalische, dann sind die basischen Gruppen ungeladen, während die sauren Gruppen ihre Protonen abgeben. Die Nettoladung ist also negativ. Im elektrischen Feld veranlassen sie die Wanderung der Proteine zur positiven Anode.

Das Ladungsvorzeichen bestimmt also die Wanderungsrichtung, während die Wanderungsgeschwindigkeit vom Dissoziationsgrad und der Größe und Gestalt (Reibungswiderstand) der im elektrischen Feld wandernden Teilchen bestimmt wird. Ladungsvorzeichen und Dissoziationsgrad sind vom pH-Wert abhängig. Dieser muß daher während der Fraktionierung der Proteine konstant gehalten werden, was durch einen geeigneten Puffer gewährleistet wird.

Allgemein muß der Puffer verschiedene Voraussetzungen erfüllen:

1. Er soll so wenig Ionenarten wie möglich enthalten - höherwertige Ionen sind zu vermeiden, da sie die Wanderungsgeschwindigkeit durch elektrostatische Wechselwirkung der Teilchen mit den Puffersalzen unkontrollierbar beeinflussen (41).
2. Es sollen langsam wandernde Ionen verwendet werden, damit eine geringe elektrische Leitfähigkeit resultiert und ein möglichst hohes Spannungsgefälle angelegt werden kann (1).
3. Die Ionenstärke soll nicht kleiner als $0,1 \mu$ sein, da sonst die Pufferwirkung nicht ausreicht, aber auch nicht größer als $0,1 \mu$ weil sonst das anlegbare Spannungsgefälle zu klein wird (1).

Vergrößerung der Ionenstärke bedingt nämlich eine Zunahme der Leitfähigkeit und diese steht im direktem Zusammenhang mit der Feldstärke, die dem Quotienten aus Stromdichte J (Amp cm^2) und spezifischer Leitfähigkeit κ ($\Omega^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) entspricht: $E = \frac{J}{\kappa} \left(\frac{\text{Volt}}{\text{cm}} \right)$ (41).

Eine geringe Leitfähigkeit vergrößert demnach das Spannungsgefälle und somit die Trenngeschwindigkeit eines Gemisches. Diese muß hoch gehalten werden, weil durch den Einfluß der Diffusion die Fronten verbreitern und bei zu geringer Trenngeschwindigkeit ohne Absätze ineinander übergehen würden. Andererseits kann das Spannungsgefälle nicht beliebig hoch gewählt werden, weil die damit erhöhte Stromstärke ($U = R \times I$) eine unzulässige Erwärmung (Joulesche Wärme) bedingen würde.

e) Entwicklung der Elektrophorese

α) freie Elektrophorese

Die einfachste Form der Elektrophorese führten PICTON und LINDNER (52), HARDY (17) und MICHAELIS (42) in der Nernst'schen U-Rohranordnung durch. Auf dieser Grundlage entwickelte TISELIUS (69), gestützt auf SVEDBERG und SCOTT (67) 1937 die heute noch gültige Versuchsanordnung der freien EP, wobei das Proteingemisch unmittelbar im Lösungsmedium der Pufferlösung getrennt wird. Mit dieser Methode gelingt die Aufspaltung im Trennrohr lediglich in Komponentensummen, d.h. nur die schnellste (Albumine) bzw. die langsamste (Globuline) Komponente erscheint in reiner Form, während die übrigen Komponenten sich entsprechend ihrer Wanderungsgeschwindigkeit überlagern.

Da bei jeder Elektrophorese an der Grenzfläche der Flüssigkeitswand eine Elektroosmose stattfindet, eine Kraft, die die gesamte Flüssigkeitssäule in Bewegung setzt, muß die begrenzende Fläche klein gehalten und mit relativ großer Flüssigkeitsmenge gearbeitet werden. Dies erfordert bei der U-Rohranordnung einen ziemlich großen apparativen Aufwand.

β) Träger-Elektrophorese

Die Trägerlektrophorese brachte entscheidende Vorteile: Sie eignet sich auch für sehr kleine Probenmengen unter 1 mg (Mikroelektrophorese). Die aufgetrennten Zonen sind stabil, eine Verschiebung der Proteinzonen und erneute Vermischung von getrennten Komponenten durch Konvektion und Diffusion wird vermieden. Da die einzelnen Zonen isoliert werden können, ist auch eine Weiterverarbeitung möglich (präparative EP). Die Anfärbbarkeit der Fraktionen und anschließende photometrische Bestimmung (Extinktionsmessung) erlauben sogar eine Aussage über ihre Konzentrationen (quantitative Elektrophorese).

Die Beziehungen zwischen elektrophoretischer Beweglichkeit, Wanderungsgeschwindigkeit, Feldstärke, pH-Wert und Ionenstärke gelten gleichermaßen für die freie und die Trägerelektrophorese. Bei der Trägerelektrophorese machen sich aber noch zusätzliche Faktoren bemerkbar, die auf die Beweglichkeit und die Trennschärfe einwirken: Dazu gehören besonders die Adsorption und Sogeffekte, sowie Inhomogenität und Austauschkapazität des Trägermaterials bei Verunreinigungen durch anorganische Ionen (41).

Die ersten brauchbaren Trägermaterialien gab es ab 1950. Sie bestanden zuerst aus Papier (27) und es waren damals mehrere Autoren, die unabhängig und ohne Wissen voneinander zu derselben Entdeckung kamen (8, 10, 15, 28, 53, 70).

Weitere Entwicklungen brachten die Celluloseacetatmembranen (30, 46), deren Vorteile heute noch darin bestehen, daß die beim Filtrierpapier störenden freien Hydroxylgruppen verestert sind. Da die freien Hydroxylgruppen durch verstärkte Adsorption eine ungleichmäßige Verteilung des Stoffes im Lösungsmittel bewirken, zeigt das Resultat nach ihrer Veresterung schärfere Zonen, was die Auftrennung des Proteingemisches mit viel kürzeren Laufstrecken und Versuchszeiten ermöglicht.

Während Papier und Celluloseacetat dem Proteingemisch einen gewissen Reibungswiderstand entgegensetzten, wurden Trägermaterialien gefunden, die auf Grund ihrer Quelfähigkeit einen so hohen Wassergehalt bieten, daß dadurch praktisch die Möglichkeit der Diffusion im freien Milieu besteht (32).

Diese Voraussetzungen erfüllen die Gele. Ihre gallertige Konsistenz verhindert eine nachträgliche Vermischung der aufgetrennten Proteine durch Strömungen.

Vom Gelatine-Gel über Agar-Gel (6, 12, 25) gelangte SMITHIES 1955 (64) zum Stärkegel.

Die Gelelektrophorese trennte nach neuen Gesichtspunkten. Hinsichtlich Geschwindigkeit und Reihenfolge zeigten die Proteine ein vollkommen anderes, oft sogar umgekehrtes Verhalten, als man es bisher gekannt hatte (48). Es war SMITHIES (64), der bei seinen Versuchen den Molekularsiebeffekt als Ursache für diese Erscheinung erkannte. Erste Erwägungen in dieser Richtung wurden, jedoch ohne befriedigendes Ergebnis, schon von SYNGE und TISELIUS (68) gemacht.

Das Molekularsieb kommt durch die wassergefüllten Hohlräume zustande, die sich entsprechend dem Hydrolysegrad des verwendeten Stärkepul-

vers so variieren lassen, daß die Moleküle ab einer gewissen Form und Größe in ihre Maschen hineinschlüpfen und dort festgehalten werden. Die großen Moleküle dagegen machen diesen Umweg nicht und gelangen früher ans Ziel.

Kurz darauf veröffentlichte POULIK (55) seine Beobachtungen mit diskontinuierlichen Puffersystemen. Er benützte einen Borat-Puffer als Elektrodenflüssigkeit und einen Citrat-Puffer im Stärkegel. Diese Diskontinuität vermochte das Auflösungsvermögen des Trägers weiter zu verbessern.

Ähnlich wie Stärkegel verhält sich das Polyacrylamidgel, ein synthetisches Polymerisationsprodukt aus chemisch definierten Grundstoffen. Der neue Vorteil besteht in einem besonders hohen Reinheitsgrad und der, unter konstanten Bedingungen jederzeit möglichen Reproduzierbarkeit (48). Adsorption und Elektroosmose spielen erstmalig keine Rolle mehr (41).

Während RAYMOND und WEINTRAUB (56) Polyacrylamidgel zur kontinuierlichen Elektrophorese mit homogenem Puffersystem und einheitlichem pH-Wert anwandten, entwickelten ORNSTEIN und DAVIS (47) die spezielle Methode der PAA-Disc-Elektrophorese, wobei sich die Diskontinuität nicht nur auf pH-Wert und Puffersystem beschränkt, wie es bei POULIK (55) schon bekannt war. Erstmalig fanden Gelteile unterschiedlicher Porengröße Verwendung. Dazu war Polyacrylamid deshalb so geeignet, weil die Dichte des Gelgitterwerkes, das entspricht der Porengröße, über einen weiten Bereich variierbar ist. Die Gelkonzentrationen, bezogen auf Acrylamid, kann zwischen 2 und 30% liegen, wobei das Gel seine hohe Transparenz nicht verliert. Neben den genannten Vorzügen schätzt man noch weitere Eigenschaften des Polyacrylamids: Dieser Stoff ist hochflexibel, thermostabil und von wechselndem pH-Wert unbeeinflußbar.

2. Besondere Elektrophorese-Formen

a) Die Immunoelektrophorese

In erster Linie qualitative Aussagen vermittelt die von GRABAR und BURTIN (14) erprobte Immunoelektrophorese. Ihre erweiterte Auftrennungsmöglichkeit beruht auf einer Kombination des physikalisch-chemischen Vorganges der Elektrophorese mit einer daran anschließenden, im selben Milieu durchgeführten immunchemischen Reaktion zwischen den Antigenen und einem homologen Antikörperpräparat. Hierbei läßt man die elektrophoretisch getrennten Proteine gegen ein zur Trennungslinie senkrecht aufgetragenes Antiserum diffundieren. Jede Antigenkomponente des aufgetrennten Serums präzipitiert dann mit dem ihr entsprechenden Antikörper des Antiserums in Form eines halbkreisförmigen Fällungsbogens bzw. einer langgestreckten Linie. Für die Position dieser Präzipitate sind neben der elektrophoretischen Beweglichkeit die Diffusionsgeschwindigkeit und die Konzentration der betreffenden Proteine maßgebend.

Die zahlenmäßige Erfassung der Komponenten eines Proteingemisches läßt sich mit diesem Verfahren gegenüber der einfachen, d.h. nicht mit immunologischen Reaktionen kombinierte Elektrophorese um das drei- bis vierfache steigern (62), da Proteinfractionen, die in der Transportphase (unter dem Einfluß des Gleichstromfeldes) dieselbe elektrophoretische Beweglichkeit zeigen, sich in der zweiten Phase durch ihre typischen Diffusionsgeschwindigkeiten und den spezifischen Antigendeterminanten weiterdifferenzieren können.

Als Trägermaterial finden ausschließlich Agar-Gele Verwendung, die für immuno-elektrophoretische Analysen zahlreiche Vorteile bieten (13):

1. Der hohe Wassergehalt, der die elektrophoretische Wanderung derjenigen im flüssigen Medium vergleichbar macht.
2. Die strukturelle Beschaffenheit des Gels, die eine freie Diffusion der Substanzen vor und nach der Elektrophorese verzögert.
3. Eine relativ gute Diffusion infolge der Molekularbewegung, wodurch der Ablauf der immunologischen Reaktion ermöglicht wird.

Für ein gutes Resultat müssen die Gele zusätzlich bestimmten Ansprüchen hinsichtlich Elastizität, Neutralität und Transparenz genügen. Da aber auch der für die Immuno-elektrophorese verwendete Reinagar keine absolut neutrale Substanz ist, wird die Elektrophorese von einem Sekundärphänomen, der Elektroendosmose überlagert. "Letztere besteht in einer Bewegung

der gesamten im Gel enthaltenen Flüssigkeit in entgegengesetzter Richtung zur elektrophoretischen Wanderung" (13). "Die Position einer Substanz bei Beendigung der Elektrophorese ist also eine Resultante ihres Transportes durch den elektrischen Strom und ihrer Verlagerung durch die Elektroendosmose." (13)

Die Bewegung stark geladener Substanzen wird daher verringert, während Substanzen mit schwacher Ladung durch die Kraft der Elektroendosmoseströmung in ihrer Wanderungsrichtung zum entgegengesetzten Vorzeichen abgelenkt werden. Um zu verhindern, daß die im überwiegenden Maße vom Elektroendosmosestrom getragenen Substanzen über die Gelfläche hinauswandern, wird das zu untersuchende Material in der Mitte der Trennstrecke aufgetragen. So können innerhalb der Gelplatte die stark geladenen Fraktionen zur Anode wandern, die neutralen und schwach geladenen zur Kathode.

Um die elektrophoretische Laufzeit abzukürzen und damit die Trennungsschärfe zu verbessern, wählt man eine möglichst hohe Stromspannung, die jedoch wegen der gleichzeitig auftretenden Wärmeentwicklung einen bestimmten Grenzwert nicht überschreiten darf.

Die beiden Elektrodengefäße werden mit Puffer angefüllt, der zwischen Anode und Kathode über Fließpapierstreifen und Gelschicht die leitende Verbindung schafft. Das Fließpapier, das mit dem einen Ende dem Gelrand des Objektträgerrahmens anhaftet, taucht mit dem anderen Ende in die Pufferlösung, wodurch seine Dochtwirkung zur Entfaltung kommt.

Die immunoelektrophoretische Analyse ist eine sehr empfindliche Methode, bei der bereits wenige Mikrogramme einer Substanz durch die hohe Spezifität, mit der jedes Antigen mit seinem korrespondierenden Antikörper reagiert, nachgewiesen werden können.

Voraussetzung ist allerdings, daß unlösliche Antigen-Antikörper-Komplexe entstehen, was ein bestimmtes Mengenverhältnis der beiden reagierenden Substanzen erfordert. Dabei kommt es darauf an, zu welchem der beiden Typen die präzipitierenden Antikörper gehören, d. h., ob sie vom Kaninchen und den meisten anderen Tieren stammen, oder vom Pferd.

Bei den erstgenannten verursacht lediglich ein Antigenüberschuß die Wiederauflösung der Präzipitate, wogegen die vom Pferd stammenden Immunsereen nur innerhalb eines relativ eng begrenzten Antigen-Antikörper-Verhältnisses Präzipitate ausbilden können, die sich sowohl unter

Antigen-, als auch unter Antikörper-Überschuß wieder auflösen würden. Das geeignete Mengenverhältnis kann im Vorversuch getestet werden.

Oft ist es nicht einfach, die einzelnen Präzipitationslinien mit Sicherheit dem jeweils richtigen Protein zuzuordnen. Daher bedient man sich gerne einer Hilfsmaßnahme, bei der ein zweites Antigenreservoir auf der anderen Seite der Antiserumrille zur Aufnahme eines Standard-Präparates angelegt wird. Die bekannten Präzipitate des Standard-Präparates können durch Vergleich der Positionen zur Identifizierung der Präzipitate des zu untersuchenden Materials herangezogen werden.

Seit ihrer bisherigen Anwendung hat sich gezeigt, daß die Immunoelktrophorese für praktisch alle Arbeiten auf dem Gebiete der Proteinchemie und für die verschiedensten klinischen Fragestellungen im Zusammenhang mit dem Eiweißstoffwechsel angewandt werden kann. Ein besonders breites Anwendungsgebiet hat sie neuerdings auch in der Proteinuntersuchung der Körperflüssigkeiten, wie Harn, Sperma, Speichel, Milch, Liquor, Lymphe, Organextrakten und Blasenflüssigkeit (3, 19). Der Vorteil besteht darin, daß die oft sehr eiweißarmen Körperflüssigkeiten in den meisten Fällen für die Durchführung der Immunoelktrophorese wegen der Empfindlichkeit der Präzipitationsreaktionen nicht konzentriert zu werden brauchen, so daß Artefaktbildungen, die häufig mit den Konzentrierungsprozessen verbunden sind, entfallen.

Die zu untersuchende Substanz muß nur folgende Voraussetzungen erfüllen:

1. Sie muß im wäßrigen Puffermilieu löslich sein.
2. Sie muß Antigeneigenschaften besitzen.

b) Die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese

Die Disc-Elektrophorese wird in kleinen Säulchen aus Polyacrylamidgel durchgeführt, die aus drei Teilen bestehen:

1. Ein großporiges Proben-Gel, das das Proteingemisch enthält; auf seine Polymerisation wird heute verzichtet.
2. Ein großporiges Sammelgel, in welchem die Substanzen konzentriert werden und
3. ein kleinporiges Trenngel, in welchem die Substanzen getrennt werden.

Die Gelsäule enthält Tris-Puffer und Cl^- Ionen, die Elektrodengefäße enthalten im Puffer Glykokoll-Ionen.

Für das hohe Auflösungsvermögen der Disc-Elektrophorese sind zwei physikalische Effekte verantwortlich:

- a) Der Konzentrierungseffekt nach KOHLRAUSCH (29), der sich im Sammelgel abspielt und
- b) der Molekularsiebeffekt, für den die geeignete Wahl des Trenngels entscheidend ist.

Die beiden Ionenarten der verwendeten Puffersysteme, die während der Elektrophorese in Trennrichtung mit den Proteinen wandern und den Regulationseffekt nach KOHLRAUSCH erzeugen, seien Leit- und Folgeionen genannt. Zu Beginn der Trennung befinden sich die Leitionen (Cl^-) in allen drei Gelteilen, während die Folgeionen (Glykokollionen) nur in der Pufferlösung der Elektrodengefäße enthalten sind. Durch die Wahl eines entsprechenden pH-Wertes für Proben- und Sammelgel sollen sich die effektiven Beweglichkeiten (μ) aller Ionenarten folgendermaßen anordnen:

$$\mu_{\text{Leitionen}} > \mu_{\text{Proteine}} > \mu_{\text{Folgeionen}},$$

wobei Leitionen, Protein- und Folgeionen dasselbe Ladungsvorzeichen tragen, also zur gleichen Elektrode wandern. Unterwirft man das ganze Gel-system einem elektrischen Stromfluß, so eilen die Leitionen infolge höherer Beweglichkeit den Proteinen und Folgeionen voraus und hinterlassen eine Zone geringerer Ionenstärke und damit geringerer Leitfähigkeit, wobei nach Gleichung $E = \frac{I}{\kappa}$ die Feldstärke darin zunimmt. Da sich in dieser Zone das Proteingemisch befindet, können sich dessen einzelne Fraktionen entsprechend ihrer charakteristischen Beweglichkeit μ mit verschiedener Geschwindigkeit v (nach Gleichung $v = E \cdot \mu$) vorwärtsbewegen.

Auf diese Weise erfolgt ihre Trennung in einzelne dünne Scheibchen bereits im Probengel.

ORNSTEIN nennt dieses erste Stadium der Trennung "steady-state-stacking", was die Startzonen im Fließgleichgewicht kennzeichnen soll.

MAURER (62) schreibt hierzu:

"Erreicht nun die wandernde Proteinzone, eingezwängt zwischen Leit- und Folgeionen die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel, so trifft sie dort zwei Diskontinuitäten an: Nämlich einen pH-Wechsel von bisher 6, 7 auf 8, 9 und einen Porengrößenwechsel. Der neue pH im Trenngel ist so gewählt, daß der Dissoziationsgrad der Folgeionen und damit deren Beweglichkeit um ein Vielfaches zunimmt. Dadurch gewinnen die Folgeionen eine Beweglichkeit, die der der Leitionen fast gleicht. Die Folgeionen überholen nun alle Proteine und wandern direkt hinter den Leitionen den Proteinen voraus. Nach dem damit verbundenem Feldwechsel bewegen sich die Proteine in einem Gebiet einheitlicher Feldstärke und p_H -Werte, und unterliegen, da nur noch im Glykokoll-Puffer gelöst, einer echten Zonen-elektrophorese. Dabei werden sie durch die passend gewählte Porengröße des Gels nach Molekülgröße, -gestalt und Ladung aufgetrennt."

Die durchschnittliche Porengröße wird vom Polymerisations- und Vernetzungsgrad bestimmt, der die Dichte des Gelgitterwerkes ausmacht. Diese Größe ist durch entsprechende Acrylamidkonzentrationen steuerbar, vorausgesetzt, daß eine vollkommene Umwandlung vom Monomer zum Polymer stattfinden kann (48).

Anhand theoretischer Modelle kann man berechnen, daß 7,5%ige Polyacrylamidgele eine durchschnittliche Porenweite von 50 Å und 30%ige Gele Porendurchmesser von etwa 20 Å aufweisen (48).

Acrylsäureamid liefert zusammen mit dem Vernetzer Methylen-BIS-acrylsäureamid das Polymerisations- und Vernetzungsprodukt, ein eindimensionales Maschenwerk, das durch Vernetzung der nebeneinander wachsenden Polyacrylamidketten zustandekommt.

Die Reaktion wird mit geeigneten Katalysatoren beschleunigt, wobei Riboflavin für großporiges und Ammonpersulfat für kleinporiges Gel verwendet wird. TEMED (Tetramethyläthylendiamin) wirkt zusätzlich als Accelerator, ebenso läßt Fluoreszenzlicht die Reaktion schneller ablaufen.

Da die guten mechanischen Eigenschaften des Gels in Bezug auf Viskosität, Elastizität und Festigkeit vom Polymerisationsgrad ebenso wie vom Ver-

netzungsgrad abhängen, dürfen ihre Komponenten nicht beliebig verändert werden. Eine Konzentrationserhöhung des Monomers bedingt eine Konzentrationserniedrigung des Vernetzers. Andernfalls entsteht ein nichttransparentes bröckelndes Gel. Die niedrigsten Konzentrationen sind beim Acrylamid mit 2g% und beim Methylen-BIS-Acrylamid mit 0,5g% angegeben.

3. Die Methoden quantitativer Proteinbestimmung

Die einfacheren Methoden der quantitativen Immunglobulinbestimmung beruhen auf der einer chemischen Reaktion ähnlichen Erscheinung, die beim Zusammentreffen von Antigenen und Antikörpern in Form eines Präzipitates auftritt. Die ersten Versuche mit dieser Fällungsreaktion wurden im Reagenzglas als "Ringtest" (31) erprobt. Außer einer Identifizierung der entsprechenden Antigene und Antikörper waren in solchen Versuchen jedoch noch keine weiteren Aussagen möglich.

Anders bei der eindimensionalen Doppeldiffusionsmethode (50), bei der in einem mit antiserumhaltigen Agar gefüllten Reagenzglas das darüber geschichtete Antigen einen durch Fällung sichtbar gemachten Diffusionsweg zurücklegt, der in direktem Zusammenhang mit der Konzentration des verwendeten Antigens steht.

Etwa zur selben Zeit entwickelte OUCHTERLONY (49) eine Methode der Doppeldiffusion, die die Antigene und Antikörper in verschiedenen kreisrunden Löchern auf einer mit Agar beschichteten Petrischale aufnimmt. Ein bogenförmiges Präzipitat kennzeichnet nach erfolgter Diffusion das Zusammentreffen der Antigene mit den Antikörpern.

Die einfache radiale Immundiffusion

Eine im Labor besonders gern angewandte Methode ist die "einfache radiale Immundiffusion" (38). Diese führt über einen relativ einfachen Weg zu weitgehend zuverlässigen Aussagen über die quantitativen Verhältnisse der einzelnen Immunglobuline (63).

Es werden hierbei aus einer Agar-Platte, in der spezielle Antiseren gegen die einzelnen Eiweißkomponenten gelöst sind, Löcher ausgestanzt, die zur Aufnahme einer genau abgemessenen Menge des zu untersuchenden Patientenserums dienen. Läßt man das Serum aus diesen Löchern in die antikörperhaltige Agarschicht hineindiffundieren, entsteht als Folge einer Antigen-Antikörperreaktion ein kreisrundes Präzipitat, dessen Durchmesser bzw. Quadrat des Radius sich proportional zur Antigenkonzentration verhält. Anhand einer Eichkurve mittels eines Standardserums mit bekanntem Proteingehalt läßt sich die Konzentration des Proteins im Untersuchungsserum relativ einfach ermitteln.

C.) EXPERIMENTELLER TEIL

1. Material

Zur Materialgewinnung zogen wir die bei der Kryotherapie der verrucae vulgares durch flüssigen Stickstoff (-196°C) entstehenden Blasen heran. Hierzu standen die Patienten der Ambulanz in der Dermatologischen Klinik der Universität München, zur Verfügung.

Als nähere Angaben dienten Alter und Geschlecht der Patienten, sowie die Lokalisation der Verrucae.

Nach 24 - 72 Stunden erschienen die Patienten zur Punktion der in der Zwischenzeit gebildeten Bläschen. Zur Gewinnung des zugehörigen Serums wurde frisch entnommenes Venenblut bei 3000 U/min über zehn Minuten lang zentrifugiert. Das Untersuchungsmaterial lagerte bis zur jeweiligen Weiterverarbeitung in der Tiefkühltruhe bei etwa 20°C .

Patientenstatistik:

Gesamtzahl der Patienten: 34

Geschlecht der Patienten:

<u>männl.</u>	<u>weibl.</u>
15	19

Alter der Patienten:

<u>Alter(J).</u>	<u>Anzahl</u>
unter 20	8
zw. 21-30	11
zw. 31-40	11
zw. 41-50	4
zw. 51-60	1

Lokalisation (ausschließlich Extremitäten):

<u>Hand:</u> 19	<u>Beine:</u> 1
<u>Finger:</u> 11	<u>Fuß:</u> 3

2. Methoden

a) Die Immunelektrophorese

Die Durchführung der Immunelektrophorese erfolgte nach der Methode von SCHEIDEGGER (58), die eine Mikromodifikation der von GRABAR und

WILLIAMS (14) angegebenen Technik darstellt.

Zur Verwendung kamen die üblichen Objektträger mit einer Größe von 76 x 26 mm.

Als Agar wurde der von den Behringwerken hergestellte Reinagar benutzt, der ohne weitere Reinigungsverfahren in Gebrauch genommen werden kann.

Technik:

1. Herstellung der Pufferlösung:

Es wurde der Veronal-Puffer vom pH 8,6 und einer Ionenstärke von 0,1 μ hergestellt. Dazu wurden 19,62 g diäthylbarbitursaures Natrium und 12,95 g Natriumazetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$) in 2000,0 ml Aqua destillata gelöst, und mit 12 ml einer 1n Salzsäure unter Kontrolle eines pH-Meßgerätes auf einen pH-Wert von 8,6 eingestellt.

Bei diesem pH-Wert wandert Serumalbumin am schnellsten, die γ -Globuline wandern am langsamsten.

2. Herstellung des Agars:

1 g Reinagar der Behringwerke wurde in 25 ml des auch zur Auftrennung benutzten Puffers eingebracht und bis 100 ml mit Aqua destillata aufgefüllt, da immer etwas mehr Agar angesetzt wird, als man nachher braucht. Pro Objektträgerreihe zu 3 Objektträgern wurden 10 ml Agar benötigt, für den Rahmen, der ja zweireihig ist, also 20 ml. Weil im Versuch 3 Rahmen gleichzeitig beschickt werden sollten, fanden im ganzen 60 ml Verwendung.

Unter Rühren mit dem Glasstab ließ man die in einem Glasgefäß angesetzte Lösung über einen Bunsenbrenner zum Kochen kommen und erhitze so lange, bis der Agar homogen erschien.

Zuletzt wurde als antiseptische Substanz Merthiolat im Verhältnis 1:10 000 zur Verhinderung von Pilz- und Bakterienwachstum hinzugegeben.

3. Vorbereiten der Objektträger und Gießen der Agarschicht:

Die geschliffenen Objektträger, die von der Firma LKB, Colora Meßtechnik GmbH., Lorch (Württemberg), bezogen werden können, sollen vor Gebrauch sorgfältig gereinigt und entfettet werden. Dazu legte man sie 5 min in eine Lösung von gleichen Teilen Isopropylalkohol und Azeton, wonach sie mit einem nicht flusendem Tuch abgetrocknet und in die LKB-Rahmen für 6 Objektträger eingelegt wurden. Für einen Ver-

sich wurden 3 Rahmen so vorbereitet.

Da sie zur Aufnahme des flüssigen Agars genau waagrecht liegen mußten, damit eine gleichmäßige Dicke der Schicht erreicht wurde, legte man sie auf einen Nivellierungstisch, der vorher mit Hilfe einer Wasserwaage genau horizontal ausgerichtet wurde.

Dann verteilte man gleichmäßig über 3 Objektträger durch rasches Hin- und Herbewegen mit der Pipette 10ml Agar, der noch heiß sein mußte. Der Agar sollte den Teil auch außerhalb der Glasplatten bedecken. Die weiteren Rahmensektionen wurden auf die gleiche Weise gefüllt.

Für die Zeit, bis das Gel nach 5 min fest war, bedeckte ein Staubschutzdeckel die Plattenrahmen. Weitere 30 min wurden sie in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

Mit Hilfe eines Stanzgerätes, mit dem man völlig gleichmäßige Auftragstellen erhält, geschah dann das Anlegen der Antigendepots und der Antiserumrinne, von denen zunächst die Agarstückchen mit der Saugnadel, die an ein Vakuum (Wasserstrahlpumpe) angeschlossen war, vorsichtig aus den Auftragstellen für das Antigen herausgesaugt wurden. Die Rinne wurde erst nach beendeter Auftrennung ausgehoben, um ein Auseinanderschrumpfen der Agarschicht durch den Einfluß der Stromwärme während des Trennvorganges zu vermeiden.

Jetzt erfolgte mit der Glasspritze das Einfüllen von 0,3 μ l Patientenserum bzw. Bläscheninhalt in die auf der beschrifteten Seite liegende Auftragstelle, und der gleichen Menge Standard-Human-Serum der Firma Behring in die zweite, auf der anderen Seite der Antiserumrinne.

4. Durchführung der Elektrophorese

Für die Durchführung der Elektrophorese sind fertige Apparaturen in den verschiedensten Ausführungen mit den notwendigen Zusatzgeräten im Handel erhältlich. Bei dem von uns verwendeten Gerät, das von der Firma LKB hergestellt wird, wurden beide Puffergefäße mit ca. 700 ml Veronalpuffer gefüllt. Daraufhin wurden die Objektträgerrahmen auf die Kanten der Puffergefäße gestellt und mit Rayondochten der Kontakt zum Pufferdepot hergestellt. Erst wenn ein Deckel die Versuchsanordnung gut verschließt und ein Sicherheitsschalter durch eine Drehung über den Deckel geschoben wird, kann sich der Stromkreis im Puffersystem schließen. Der Deckel soll ein Austrocknen des Gels durch

Verdunstung verhindern.

Am Netzanschlußgerät, das den Wechselstrom in Gleichstrom transformiert, wurde pro Objektträgerrahmen eine Stromstärke von 8,5 mA gewählt, für 3 Rahmen also 25,5 mA. Bei dieser Stromstärke dauerte der Trennungsvorgang 55 Minuten.

5. Einfüllen des Immunserums

Mit einer Pipette wurden in jede der Rinnen 0,05 ml eines multivalenten Kaninchen-Anti-Human-Serums der Firma Behring eingefüllt. Um ein Ausfließen zu erleichtern, wurde der Objektträgerrahmen über einen untergelegten Gegenstand leicht schräg gelegt.

Nun wurden alle 3 Objektträgerrahmen in einen Rahmenhalter gestellt und zur Entwicklung der Immunpräzipitate für 20 Stunden in eine feuchte Kammer gebracht.

6. Fixierung des Präzipitationsbildes

Um alles nicht präzipitierte Protein aus dem Agar zu entfernen, erfolgte 2 Tage lang Wässerung in physiologischer Kochsalzlösung, die einmal täglich erneuert werden mußte. Dabei war zu beachten, daß die Bewegungen des Rahmenhalters in der Kochsalzlösung, besonders beim Eintauchen, sehr vorsichtig vorgenommen wurden.

Dann wurden die Objektträger mit aqua destillata vorsichtig abgespült und mit fusselfreiem Löschpapier der Firma Colora mit den Ausmaßen 300 x 24 mm abgedeckt. Dabei durften keine Luftblasen zwischen der Gelschicht und dem Fließpapier zurückbleiben. Im Brutschrank bei 37°C wurden die Präparate getrocknet, bis sich das Löschpapier an einzelnen Stellen von selbst abhob.

Die Streifen konnten dann vollständig abgehoben und die Objektträger aus der Reihe einzeln herausgelöst werden. Jetzt waren die Präparate zum Färben bereit. Damit die Proteine die Farbe besser annahmen, wurden die Präparate für 2-3 min in eine 2%ige Essigsäure gestellt, nach der Herausnahme vorsichtig von den letzten Fusselresten des Löschpapiers befreit und anschließend der Färbung mit Amidoschwarz unterzogen. In dem Färbebad, das aus einer Lösung von 0,05% Amidoschwarz 10B und Methanol - Eisessig (9 : 1) besteht, bleiben die Präparate 5 min. Dann erfolgte das Auswaschen mit dem Farbstofflösungsmittel Methanol-Eisessig, der folgendermaßen hergestellt wurde:

100 ml Essigsäure 96%ig

400 ml Methanol

500 ml aqua destillata

Diese Lösung wurde schließlich so oft erneuert, bis der Hintergrund der Präparate vollkommen hell erschien.

Die Auswertung der Immunelektrophorese beschränkte sich auf die wesentlichen Proteinfractionen wie

α_1 -Lipoprotein	β_1 -Lipoprotein	Transferrin	IgG
Albumin	α_2 -Makroglobulin	β_1 A	IgA
α_1 -Antitrypsin	Haptoglobulin	Hämopexin	

Dabei wurden die Präzipitationslinien mit denen des Standard-Humanserums verglichen und auf Identität überprüft und anschließend die Fraktionen des Serums denen der Bläschenflüssigkeit desselben Patienten gegenübergestellt und tabellarisch geordnet.

b) Die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese

Die Technik der Zonenelektrophorese im Polyacrylamidgel beruhte auf einer von B.J. DAVIS (9) beschriebenen Methode.

Die Versuchsanordnung bestand aus einem Dreifuß mit zwei Halterungen für das kathodische und anodische Elektrodengefäß (Durchmesser 9,7 cm, Höhe 4,5 cm), deren Verbindung über die Elektrophorese-Glasröhrchen hergestellt wurde.

Die Elektrophorese-Glasröhrchen dienten als Behälter für die Polyacrylamidgelsäulen, die sich aus großporigem Sammelgel, kleinporigem Trenngel und dem Probengel zusammensetzten.

Deren Zubereitung begann mit dem Ansatz der Stammlösungen A-F:

A.)	1 N HCl	48,0 ml	B.)	1 N HCl	48,0 ml
	Tris	36,6 g		Tris	5,98 g
	TEMED	0,23 ml		TEMED	0,45 ml
	aqua dest. ad	100,0 ml		aqua dest. ad	100,0 ml
	pH 8,9			pH 6,7	
C.)	Acrylamid	28,0 g	D.)	Acrylamid	10,0 g
	BIS	0,735 g		BIS	2,5 g
	aqua dest. ad	100,0 ml		aqua dest. ad	100,0 ml
E.)	Riboflavin	4,0 mg	F.)	Ammoniumsulfat	140,0 mg
	aqua dest. ad	100,0 ml		aqua dest. ad	100,0 ml
	(ca. 4 Wochen bei 4°C haltbar)			(Jedes Mal vor Gebrauch neu ansetzen!)	

Außerdem wurden benötigt:

G.) Bromphenolblau 10 mg
aqua dest. ad 100,0 ml

H.) Tris 6,0 g
Glycocoll 28,8 g
aqua dest. ad 1000,0 ml
pH 8,3
(Der Tris-Puffer ist bei
4°C ca. 4 Wochen haltbar.
Verdünnung: 1 : 10)

Das Trenngel, von dem ca. 1,25 ml bis 2 cm unter den Rand der auf Gum-
mistopfen aufgestellten Glasröhrchen eingefüllt wurden, entstand aus 1 Teil
Stammlösung A, 2 Teilen Stammlösung C, 4 Teilen Stammlösung F und
3 Teilen aqua dest.

Um den Meniscus des Trenngels auszugleichen und um gleichzeitig eine
Markierung der im Versuch wandernden Ionenfront zu erhalten, wurde
das Trenngel mit aqua dest., dem etwas Bromphenolblau zugesetzt war,
überschichtet. (Der Zusatz von 0,01%igem Bromphenolblau beträgt 5 Trop-
fen auf 20 ml aqua dest.)

Zur anschließenden Polymerisation benötigte das Gel 45 min vor einer
Leuchtstoffröhre (15 W Osram universalweiß, BBC-Vorschaltgerät für
1 Leuchtstoffröhre 15 W P 222).

In der Zwischenzeit erfolgte die Herstellung des Sammelgels aus:

1 Teil Stammlösung B
2 Teilen Stammlösung D
1 Teil Stammlösung E
4 Teilen aqua dest.

0,115 ml wurden davon auf jede Trenngelsäule gegeben und ebenfalls mit
Bromphenolblau gefärbten aqua dest. überschichtet. Die Polymerisation
des Sammelgels erforderte 15 min vor der Leuchtstoffröhre.

Inzwischen wurden je 0,1 ml Probenmaterial (Serum bzw. Bläscheninhalt)
mit der entsprechenden Menge Sammelgel auf eine Gesamteiweißkonzentra-
tion von 0,6 g% gebracht.

Vor Einfüllung des Probenmaterials wurden die, mittlerweile beschrifteten,
Glasröhrchen an die Elektrophoreseapparatur angebracht, wo sie von
unten her am Kathodengefäß in die dafür vorgesehenen Löcher gesteckt und
durch Gumminippel befestigt und abgedichtet wurden. In die oberen Glas-
röhrchenöffnungen, die in den Innenraum des Kathodengefäßes hineinrag-
ten, wurden mit einer Pipette je 0,06 ml der vorbereiteten Probenverdün-
nungen eingefüllt, dann vorsichtig mit Tris-Puffer überschichtet, bis das
Kathodengefäß etwa zu 3/4 voll war und beim Auflegen des Deckels die da-

ran befestigte Platinelektrode genügend in die Pufferlösung eintauchen konnte.

Der übrige Tris-Puffer wurde in das am Dreifuß tiefergelegene Anodengefäß gegossen und die am Kathodengefäß aufgehängten Glasröhrchen mit ihrem unteren Ende etwa 1 cm darin eingetaucht.

Eventuell hängengebliebene Luftblasen konnten mit einer Nadel leicht entfernt werden.

Somit waren die Voraussetzungen für das Schließen des Stromkreises gegeben. Die Stromstärke pro Säule sollte 4 mA betragen und während der gesamten Laufzeit von 35 - 40 min konstant gehalten werden.

Sobald der Bromphenolblauring die Endmarke, 0,5 cm vor der unteren Röhrchenöffnung, erreicht hatte, war das Ende der Laufzeit erreicht.

Kolorimetrie:

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Glasröhrchen in eine mit Eiswasser gefüllte Schale gelegt und unter drehenden Bewegungen im Wasser mit einer Nadel vorsichtig die Gelsäulen herausgelöst.

Diese kamen für eine Stunde in eine Färbelösung aus 0,5% Amidoschwarz 10 B und Methanol-Eisessig (9 : 10). Amidoschwarz 10 B ist ein Farbstoff mit hoher Eiweißaffinität, färbt Eiweißkomponenten besonders intensiv an und soll quantitativ an die Proteine angelagert werden, was die photometrische Messung der Farbindensität ermöglicht.

Die überschüssige Farbe wurde anschließend mit Wasser abgewaschen. Dann folgte ein Entfärbevorgang im Elektrophoreseapparat mit 0,7 %iger Essigsäure solange, bis sich die blau gefärbten Proteinbanden deutlich vom wieder klar gewordenen Gel abhoben.

Dies dauerte etwa 1 1/2-2 Stunden, bei einer Stromstärke von 7 - 8 mA je Säule.

Nun konnten die Gelsäulen zur Aufbewahrung, mit 0,7 %iger Essigsäure, in Halbmikro-Röhrchen umgefüllt werden.

Photometrie:

Die Auswertung erfolgte im Eppendorf-Photometer bei 578nm Wellenlänge. Über einen gekoppelten Direktschreiber wurden die Extinktionen bei kontinuierlichem Vorschub der Gelsäule graphisch dargestellt, wobei als Abszisse die Zeit, proportional zur Länge der einzelnen Banden, als Ordinate die Extinktion eingesetzt wurde.

Da durch die Trägheit des Schreibers nicht vor jedem neuen Spike der tatsächliche Ausgangswert, bezüglich der Extinktion, angezeigt wurde und außerdem die Auswaschungsgrade bei den Gelsäulen hinsichtlich des Restfarbstoffgehaltes unterschiedlich waren, erübrigte sich die absolute Bestimmung der einzelnen Spitzen und ihrer dazugehörigen Flächen durch mathematische Integration. Vielmehr lag das Ziel der graphischen Darstellung darin, die Ergebnisse der Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese anschaulicher und übersichtlicher zu gestalten, wodurch der quantitative Vergleich der einzelnen Proteinbanden untereinander und ihre Identifizierung wesentlich erleichtert wurden.

Als weiteres Hilfsmittel hierzu diente die maßstabsgerechte Übertragung der Pherogramme auf Millimeterpapier mit fortlaufender Numerierung der einzelnen Spitzen im Proteinbandenspektrum.

c) Die einfache radiale Immundiffusion

Zur Anwendung kamen die von der Firma Behring hergestellten Partigen-Immunodiffusionsplatten. Diese enthalten eine gebrauchsfertige Agar-schicht, in der die einzelnen spezifischen Antiseren gelöst sind.

Von den zwölf vorgestanzten Löchern werden in die ersten drei jeweils bestimmte Verdünnungen eines Standard-Humanserums (mit physiologischer Kochsalzlösung) eingesetzt, während die übrigen neuen Vertiefungen zur Aufnahme des Patientenserums, ebenfalls in einer bestimmten Verdünnung vorgesehen sind.

Zu Beginn des Versuches wurden die Partigen-Platten sogleich aus ihrer luftdichten Verpackung herausgenommen und die Deckel geöffnet, damit das überschüssige Kondenswasser rechtzeitig verdunsten konnte und vor dem Einfüllen die Löcher frei von Wasser waren.

Für die Herstellung der Verdünnungsreihe wurden vorbereitet:

Reagenzgläser,

geeichte Pipetten mit Graduierungen von 0,1 ml, 1 ml und 0,2 ml,

physiologische Kochsalzlösung,

stabilisiertes Standard-Humanserum und

die Untersuchungsmaterialien.

Für die Bestimmung von IgG, IgA, IgM und β_1A wurden jeweils bestimmte Verdünnungen des Testserums und der Probenseren hergestellt:

	IgG		IgA		IgM		β_1A	
	Testserum	Probens.	Tests.	Pr.s.	Tests.	Pr.s.	Test.	Pr.s.
Verdünnung	1 : 20	1 : 50	1 : 4	1:10	1 : 1	1:4	1:1	1:4
	1 : 40		1 : 8		1 : 2		1:2	
	1 : 80		1 : 16		1 : 4		1:4	

Von den entsprechenden Verdünnungen wurden mit Hilfe einer Mikroliter-spritze jeweils 0,2 μ l in die numerierten Löcher der Agarplatte aufgetragen und ihre Zugehörigkeit protokolliert.

Vor dem Verschluß der Platte wurde das der Packung beigegefügte Schwämmchen mit Kochsalzlösung angefeuchtet und in den inneren Ring der Platte gelegt.

Auf einem Nivellierungstisch, in waagrecht Position, wurde die Platte zwei Tage lang stehen gelassen, bis der Endpunkt der Diffusion erreicht

war.

Dann konnten mit einer Meßlupe, die auf der Plattenrückseite bei abgenommenen Deckel aufgesetzt wurde, die Durchmesser (d) der Präzipitatringe auf 0,1 mm genau ausgemessen werden.

Das Erstellen einer Bezugskurve erfolgte auf linearem Millimeterpapier, auf dem an der Ordinate der quadrierte Radius r^2 (mm^2) und an der Abszisse die Konzentration in mg/100 ml abgetragen wurden. Trug man die quadrierten Radiuswerte der drei Standard-Verdünnungen als Funktion ihrer bekannten Proteinkonzentrationen auf, so erhielt man drei Punkte, aus denen eine Gerade resultierte. Anhand dieser Eichkurve konnten, nach Berechnung von r^2 , die gesuchten Proteinkonzentrationen der Probenseren, unter Berücksichtigung der Verdünnung, ermittelt werden.

Während das Ablesen der Präzipitatringe bei den IgG-, IgA- und β_1 A-Platten schon vor der Färbung möglich war, bedurfte es bei den IgM-Platten einer Vorbehandlung mit Gerbsäure.

Dazu legte man die Platte 2-3 Tage in phosphatgepufferte physiologischer NaCl-Lösung mit einem pH-Wert von 7,2. Dann wurde die Platte 30 Minuten mit 4%iger, wäßriger Tannin-Lösung überschichtet und zum Schluß für eine Stunde in Wasser gelegt.

Hierauf konnten die vorher kaum sichtbaren Präzipitatringe leicht abgelesen werden.

Der abschließende Färbevorgang war für alle Platten gleich:

- 1.) In einer mit NaCl gefüllten Wanne die Platten 2 Tage lang stehen lassen - Bad nach 1 Tag wechseln
- 2.) Nach der Herausnahme mit aqua dest. kurz überspülen
- 3.) Platte für 2 Min. mit 2%igem Eisessig bedecken - dann abgießen
- 4.) 0,05%ige Amidoschwarzlösung aufgießen und 8 Min. einwirken lassen
- 5.) 1-2 Tage lang Entfärben in Methanol-Eisessig (9:1)
- 6.) Daraufhin 1 Tag lang mit Glycerin abdecken, dann Glycerin zurückgießen und Platte trocknen lassen
- 7.) Platte verschließen und zur Dokumentation auszeichnen.

3. Ergebnisse

a) Zur Immunelektrophorese

Zur Auswertung der Immunelektrophorese standen 54 Elektropherogramme zur Verfügung. Diese Anzahl bestand zur einen Hälfte aus Serum-, zur anderen Hälfte aus den dazugehörigen Blasenpräparaten. Von diesen 27 Blasenproben war 19 hämorrhagisch, 8 waren ohne Blutbeimengung. Die Identifizierung der Pherogramme erfolgte anhand der bei GRABAR und BURTIN (13) beschriebenen charakteristischen Merkmale der Immunpräzipitate. Diese bestehen in der Verschiedenartigkeit von Bogenstärke, Bogenlänge, Lagebeziehung zum Antigenreservoir, zur Antikörperrinne und zu den benachbarten Präzipitatbögen. Als zusätzliches Hilfsmittel zur Aufklärung diente außerdem der Vergleich mit dem Pherogramm des Standardpräparates, jenseits der Antikörperrinne. Dabei war jedoch zu beachten, daß bei den verwendeten stabilisierten Standard-Humanseren der Firma Behring, laut Herstellerangaben, die labilen Proteine infolge des Stabilisierungsverfahrens fehlten, wie z.B. α_1 -Lipoprotein und β -Lipoprotein.

In den 54 Blasen- und Serumpherogrammen konnten insgesamt folgende Proteine gefunden werden (s. Abb. 1):

Albumin

α_1 -Lipoprotein

α_1 -Antitrypsin

Haptoglobulin

α_2 -Makroglobulin

β -Lipoprotein

Transferrin

β_1 A

Hämopexin

IgG

IgA



Abb. 1: Immunelektropherogramme von einer Blase und dem dazugehörigen Serum

Das Vorkommen der meisten dieser Proteine war sehr konstant. Albumin, α_1 -Lipoprotein, α_1 -Antitrypsin, Haptoglobulin, Transferrin, β_1 A und IgG waren in allen Präparaten vorhanden.

α_2 -Makroglobulin fehlte in den Pherogrammen von zwei Präparaten, wobei es sich beidemale um hämorrhagische Blasenflüssigkeiten handelte, bei denen außerdem β -Lipoprotein nicht vorhanden war. Letzteres fehlte noch in zwei weiteren, ebenfalls hämorrhagischen Blasenpräparaten, also insgesamt viermal.

Das β_1 A-Präzipitat war in einigen Blasen- und Serumbildern sehr schwach ausgeprägt und bei zehn Präparaten schließlich überhaupt nicht mehr nachzuweisen. Darunter fielen sechs Blasenflüssigkeiten (eine helle, fünf hämorrhagische) und vier Seren.

Besonders undeutlich waren die Präzipitate des Immunglobulins IgA, welche etwa bei der Hälfte der Präparate gerade noch, im restlichen Anteil überhaupt nicht mehr, zu erkennen waren. Regelmäßigkeiten zugunsten der Blasen oder der Seren traten dabei nicht auf.

Die Auswertung der Immunelektrophorese ist in folgender Tabelle enthalten:

Tab. 1:

Auswertung der Immunelektrophorese

Abkürzungen:

Alb.
schnellw. Lipopr.
 α_1 -Antitr.
Haptogl.

= Albumin
= schnellwanderndes Lipoprotein
= α_1 -Antitrypsin
= Haptoglobulin

langsamw. Lipopr.
Transf.
Hämop.

= langsamwanderndes Lipoprotein
= Transferrin
= Hämopekcin

lfd. Nr.	Präp.	Beschaffenheit des Blaseninhalates; nichtgekennzeichnete Bl. sind hämorrhagisch	Alb. schnellw. Lipopr.	α_1 -Antitr. Lipopr.	Haptogl.	α_2 -Makrogl.	langsamw. Lipopr.	Transf.	Hämop.	β_1 A	IgG	IgA
1	1B 1S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
2	2B 2S	hell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
3	3B 3S		+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)
4	4B 4S	hell	+	+	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)
5	5B 5S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
6	6B 6S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
7	7B 7S	hell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
8	8B 8S		+	+	+	+	(+)	+	+	+	+	(+)
9	9B 9S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
10	10B 10S	hell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
11	11B 11S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
12	12B 12S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
13	13B 13S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
14	14B 14S		+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)

Id. Pröp. Nr.	Beschaffenheit des Blasen- inhaltes; nichtgekennzeichnete Bl. sind hämorrhagisch	Alb. schnellw. Lipopr.	α_1 -Antitr.	Haptogl.	α_2 -Makro- gl.	langs. w. Lipopr.	Transf.	Hämop	α_1 A	IgG	IgA
15	15B 15S hell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
16	16B 16S	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
17	17B 17S hell	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	+
18	18B 18S	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
19	19B 19S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
20	20B 20S	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	(+)
21	21B 21S	+	+	+	+	(+)	+	+	(+)	+	-
22	22B 22S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
23	23B 23S	+	+	+	(+)	-	+	+	-	+	-
24	24B 24S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
25	25B 25S	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+)
26	26B 26S	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
27	27B 27S hell	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Zeichenerklärung:

+ = positiv
 (+) = schwach positiv
 - = negativ

b) Zur Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese

Zur genaueren Untersuchung kamen die Elektropherogramme (s. Abb. 2) zusammen mit den jeweiligen Auswertungskurven von 14 verschiedenen Blasenproben und ihren entsprechenden Seren. Von den 14 Blasenproben waren 9 hämorrhagisch, 5 waren ohne Blutbeimengung. Die auf Millimeterpapier maßstabsgerecht übertragenen Pherogramme wurden mit ihren Diagrammen verglichen, wobei die Durchnummerierung der Proteinbanden und der Extinktionsmaxima zahlenmäßige Übereinstimmung ergaben.

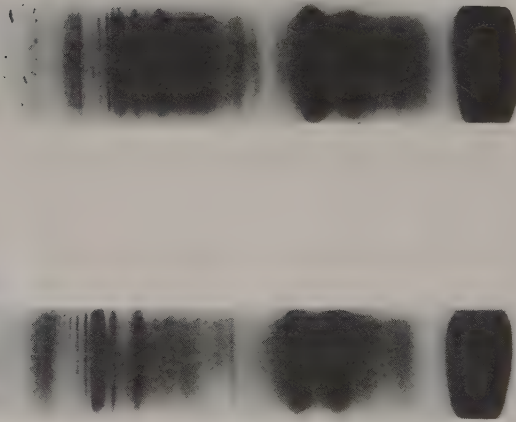


Abb. 2: Elektropherogramme einer Blase und eines Serums

Es konnten unter den insgesamt 28 Proben bei einem Serum maximal 20, bei einem Bläschen maximal 18 Proteinbanden festgestellt werden.

Demgegenüber stand ein Minimum bei einem Serum von 11, und einem Bläschen von 10 Banden. Der Durchschnitt lag bei den Blasen bei 13,6, bei den Seren bei 14,9.

Die Differenzierung der Bläschenflüssigkeiten nach hämorrhagischen und blutfreiem Inhalt ergab bei den hämorrhagischen eine Durchschnittsproteinbandenanzahl von 13,6 (Maximum: 17, Minimum: 10), bei den hellen eine von 13,5 (Maximum: 18, Minimum 12).

Alle Pherogramme zeigten ein auffällig übereinstimmendes Muster hinsichtlich der stärker und schwächer abgebildeten Banden. Den kräftigeren Banden entsprachen besonders hohe und breite Extinktionsmaxima. Ihre Identifizierung anhand der Arbeiten von GEYER, MARGHESCU und MÜLLER (11), ORNSTEIN (48) sowie BIEL und ZWISLER (2, 76) erbrachte ein quantitatives Übergewicht der nach GEYER, MARGHESCU und MÜLLER (11) bezeichneten Fraktion II, in der α_1 -Antitrypsin, Präalbumin und Albumin nachgewiesen werden konnten (11).

Ebenso konstant, hinsichtlich Vorkommen und Konzentration, war außerdem die Fraktion I mit α_1 -Glykoprotein (11).

Eine Einzelercheinung in Form einer überzähligen Proteinbande zwischen den Fraktionen I und II war bei einem Serumpräparat zu verzeichnen, dessen Blasenpherogramm sich jedoch wieder als unauffällig erwies.

Das in den Fraktionen III und IV abgebildete Proteinspektrum war größeren Schwankungen in Zahl und Intensität unterworfen. Diese Variationen beruhen nach GEYER, MARGHESCU und MÜLLER (11) auf die Vorliebe des Albumins, Aggregate zu bilden und waren daher ohne besondere Bedeutung.

Etwa im mittleren Abschnitt aller Pherogramme fiel eine sehr kräftige Bande ins Auge, die in ihrer Stärke ungefähr ein Drittel der Fraktion II ausmachte und der Lage nach Transferrin darstellen mußte, dem sich bei den meisten Präparaten, gleich ob Blase oder Serum, eine weitere kräftige Bande anschloß, das β_1 A. Dieses verhält sich bei gealterten Seren zu β_1 C umgekehrt proportional (11) und rückte daher bei den vorliegenden Elektropherogrammen in den Vordergrund.

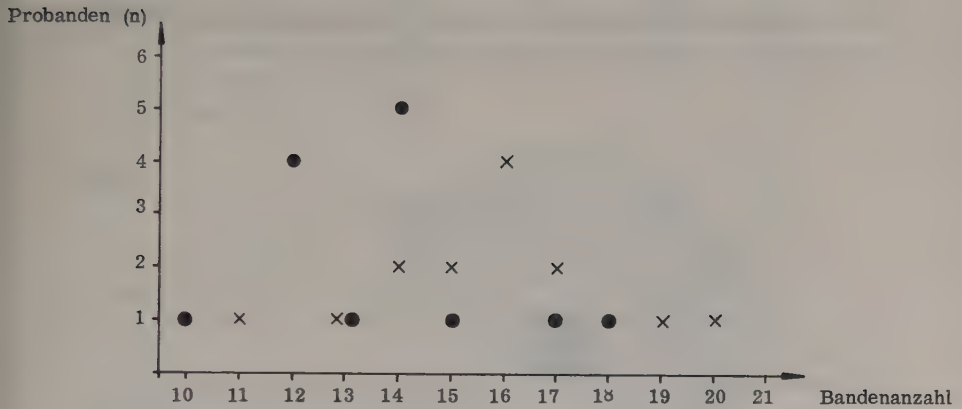
Nicht bei allen Präparaten gleich deutlich zu sehen, war im letzten Abschnitt eine Linie, bei der es sich wohl um Haptoglobin in der Fraktion VI handelte.

Zuletzt seien noch die ein bis zwei gut sichtbaren Banden erwähnt, die ganz am Ende der Gelabschnitte regelmäßig auftauchten und von denen die anodenwärts gelegene als α_2 -Makroglobulin, die kathodenwärts gelegene als β -Lipoprotein identifiziert wurden (11).

Zusammenfassend konnte gesagt werden, daß sich Blasen- und Serumpherogramme im wesentlichen nicht voneinander unterschieden. Nur die Anzahl der Banden war bei den Blasen im Durchschnitt etwas niedriger zu verzeichnen als bei den Seren. Zwei Ausnahmen hiervon gab es bei zwei hellen Blasenflüssigkeiten, deren Pherogramme je eine Bande mehr aufwiesen als ihr Serum. Außerdem kam es bei zwei weiteren, hämorrhagischen Blasenpherogrammen zu zahlenmäßiger Übereinstimmung mit den zugehörigen Serumpherogrammen.

Alle anderen Blasenpherogramme, von hellen und hämorrhagischen Flüssigkeiten, hatten bis zu fünf Banden weniger, als die entsprechenden Seren.

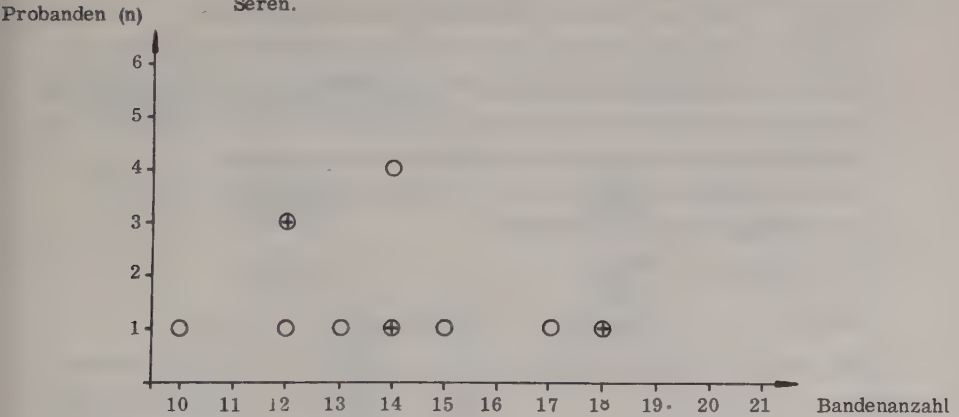
Eine entsprechende Übersicht sollten die beiden nachfolgenden Tabellen verschaffen:



● = Blasen

× = Seren

Tab. 2: Übersichtliche Darstellung der Proteinbandenzahl bei Blasen und Seren.



○ = Hämorrhagische Blasenflüssigkeit

⊕ = Helle Blasenflüssigkeit

Tab. 3: Übersichtliche Darstellung der Proteinbandenzahl bei hämorrhagischen und nicht hämorrhagischen Blasenflüssigkeiten.

c) Zur einfachen radialen Immundiffusion

Die quantitativen Bestimmungen (s. Abb. 3) stützten sich auf 38 Einzelwerte für IgG, 43 für IgA, 36 für IgM und 37 für β_1 A.

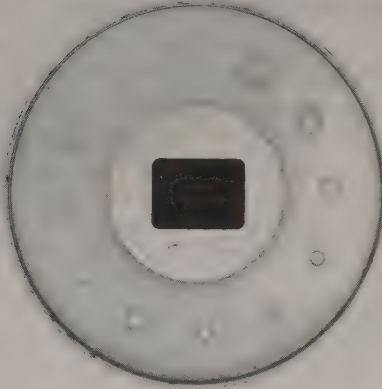


Abb. 3: Radiale Immundiffusion auf einer Partigenplatte

Da das nur in kleineren Mengen zur Verfügung gestandene Blasenmaterial schneller verbraucht war als das Serum, konnten von diesen mehr Einzelwerte bestimmt und in die Statistik aufgenommen werden.

Folgende Tabelle zeigt die Blasen- und Serumbestimmungen in ihrer zahlenmäßigen Zusammensetzung:

B = Blasen, S = Seren

<u>Tab. 4:</u>	IgG	IgA	IgM	β_1 A
B	19	19	15	16
S	19	24	21	21
B + S	38	43	36	37

Die Geschlechtsverteilung des Patientengutes wird aus nachstehenden Zahlen ersichtlich:

Tab. 5:

Blasen:	IgG	IgA	IgM	$\beta_1 A$
männl.	13	12	10	10
weibl.	6	7	5	6
m. + w.	19	19	15	16

Seren:

	IgG	IgA	IgM	$\beta_1 A$
männl.	13	12	10	10
weibl.	6	12	11	11
m. + w.	19	24	21	21

Im arithmetischen Mittel ergaben sämtliche Versuchsreihen zusammen-
genommen, für die vier untersuchten Proteine (in mg %):

Tab. 6:

	IgG	IgA	IgM	$\beta_1 A$
B	962	130,2	65,7	49
S	1471	299	206	107

Bildete man die Quotienten zwischen den Zahlenergebnissen einer Pro-
teinart, mit dem Serumwert im Zähler und dem Blasenwert im Nenner,
so ergaben sich folgende Faktoren:

Tab. 7:

$$\frac{\text{IgG(S)}}{\text{IgG(B)}} = 1,53 \quad \frac{\text{IgA(S)}}{\text{IgA(B)}} = 2,3$$

$$\frac{\text{IgM(S)}}{\text{IgM(B)}} = 3,1 \quad \frac{\beta_1 A(S)}{\beta_1 A(B)} = 2,2$$

Innerhalb des Serums und innerhalb der Blasenflüssigkeit ergaben sich
nachstehende Verhältnisse:

Tab. 8:

<u>innerhalb des Serums:</u>	<u>innerhalb der Blasenflüssigkeit:</u>
IgG : IgA = 5:1	IgG : IgA = 7:1
IgG : IgM = 7:1	IgG : IgM = 14,5:1
IgG : β_1 A = 14:1	IgG : β_1 A = 20:1
IgA : IgM = 1,5:1	IgA : IgM = 2:1
IgA : β_1 A = 3:1	IgA : β_1 A = 3:1
IgM : β_1 A = 2:1	IgM : β_1 A = 1,3:1

Eine Unterscheidung nach männlicher und weiblicher Herkunft des Probenmaterials führte bei Blasen und Seren zu folgender Aufgliederung der einzelnen Werte (in mg %):

Tab. 9:

<u>Blasen:</u>	IgG	IgA	IgM	β_1 A
männl.	800	118,3	42,6	48,5
weibl.	1 312,5	151,9	112	49,6
m. + w.	992	130,2	65,7	49
<u>Seren:</u>				
männl.	1 357,9	259,2	152,4	100,9
weibl.	1 716,7	340,2	255	112,6
m. + w.	1 471	299	206	107

Nach Geschlechtern getrennt, sahen die Verhältniszahlen dann folgendermaßen aus:

Tab. 10:

<u>männl.:</u>	<u>weibl.:</u>
$\frac{\text{IgG(S)}}{\text{IgG(B)}} = 1,8$	$\frac{\text{IgG(S)}}{\text{IgG(B)}} = 1,3$
$\frac{\text{IgA(S)}}{\text{IgA(B)}} = 2,2$	$\frac{\text{IgA(S)}}{\text{IgA(B)}} = 2,2$
$\frac{\text{IgM(S)}}{\text{IgM(B)}} = 3,6$	$\frac{\text{IgM(S)}}{\text{IgM(B)}} = 2,3$
$\frac{\beta_1\text{A(S)}}{\beta_1\text{A(B)}} = 2,1$	$\frac{\beta_1\text{A(S)}}{\beta_1\text{A(B)}} = 2,1$

Eine letzte Aufschlüsselung der Blasenmaterialien nach hämorrhagischem bzw. hellem Inhalt ergab folgende Zusammensetzung und Ergebnisse (in mg %):

Tab. 11:

zahlenmäßige Zusammensetzung:

	IgG	IgA	IgM	β_1 A
hämorrhagisch	14	14	10	11
hell	5	5	5	5
hämorrh. + hell	19	19	15	16

Tab. 12:

Ergebnisse (in mg %):

hämorrhagisch	910,7	113,2	59,6	45,3
hell	1105	173,6	78	56
hämorrhagisch + hell	962	130,2	65,7	49

D.) DISKUSSION

Die immunologische Untersuchung von Seren stieß schon längere Zeit auf keine größeren technischen Schwierigkeiten und war auch mit aufwendigeren elektrophoretischen Versuchsanordnungen bereits möglich. Eine sich daran anknüpfende Fragestellung blieb jedoch noch längere Zeit unbeantwortet: Der immunologische Vergleich eines Serums mit der Flüssigkeit einer Blase.

Die Entwicklung der Mikroelektrophorese und insbesondere der Immunoelektrophorese, brachte den entscheidenden Vorteil, daß nur sehr kleine Flüssigkeitsmengen benötigt wurden. Erst dadurch war die Durchführung dieser Untersuchungen ermöglicht, da von der Blasenflüssigkeit naturgemäß nur kleinere Mengen zur Verfügung standen.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Vergleichsuntersuchungen anzustellen, um das qualitative und quantitative Verhalten der einzelnen Proteine bzw. ihrer Fraktionen im Serum und in der Flüssigkeit artifiziell entstandener Blasen nachzuprüfen. Zur qualitativen Aussage eignete sich besonders die Immunoelektrophorese (20), außerdem die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese, die zudem zu halb-quantitativen Untersuchungen herangezogen wurde. Das Verfahren der radialen Immundiffusion diente dagegen ausschließlich den quantitativen Bestimmungen der für alle Immunreaktionen des Organismus so bedeutenden Proteine IgG, IgA und IgM (Nomenklatur nach Übereinkunft der Weltgesundheitsorganisation vom Jahre 1964 (74)). Außerdem interessierte die quantitative Ermittlung von β_1A .

Innerhalb der Untersuchungen an Blasenflüssigkeiten wurde eine Unterscheidung nach hämorrhagischem und hellem Aussehen getroffen.

Die Immunoelektrophorese:

Die Auswertung der Immunoelektrophorese, die jedoch nur als Gesamtergebnis, im Überblick betrachtet werden sollte, ließ als erstes sofort erkennen, daß kein Präparat ein abnormes Protein enthielt, so wie es z.B. bei Pemphigus vulgaris in der Blasenflüssigkeit auftritt (72), oder, in Blase und Serum, bei Morbus Waldenström (39). Auch ein besonderes Präzipitat bei den Blasen, wie MOULIN und MANUEL (43) es in einigen Fällen beschrieben und, in Anlehnung an die Arbeit

von HERRMANN und SCHULZ (19), als Zeichen einer Fibrinolyseaktivität bei der Blasenentstehung gewertet haben, konnte nicht aufgefunden werden.

Eindeutig war jedoch, daß die wichtigsten Präzipitate, die im Serum zu sehen waren, auch in der Blasenflüssigkeit gefunden werden konnten, entsprechend den Ergebnissen anderer Autoren (19, 24, 33, 34, 43, 54, 73 u.a.). Zu den regelmäßig erscheinenden Präzipitaten zählten Albumin, das schnellwandernde Lipoprotein, α_1 -Antitrypsin, Haptoglobulin, α_2 -Makroglobulin, das langsamwandernde Lipoprotein, Transferrin, Hämo-pexin, β_1 A, IgG und, bei einigen Präparaten, IgA.

Da jedoch die Wanderung in einem Gel durch zahlreiche Faktoren beeinflußt wird, war die Verwendung der elektrophoretischen Beweglichkeit als Kriterium zur Identifizierung der einzelnen Proteine nicht unbegrenzt. Als Unsicherheitsfaktor gilt zunächst das Gel selbst. Die Beschaffenheit des Agar-Agars variiert entsprechend seiner Herkunft und sogar entsprechend einzelner Abpackungen, denn es handelt sich hierbei um kein standardisiertes Naturprodukt.

In schwer kontrollierbarer Weise wirkt sich auch der Wassergehalt des Gels während der Elektrophorese aus. Er ändert sich in Abhängigkeit von elektroosmotischen Strömungen und von der Verdunstung.

Auch durch den zeitlichen Abstand zwischen der Entnahme und der Verarbeitung des Materials wird die Beweglichkeit bestimmter Serumproteine beeinflußt. So überwiegt von den beiden eng verwandten, mit partieller Antigenidentität ausgestatteten Proteinen β_1 A und β_1 C im frisch entnommenen Material das β_1 C, im gealterten β_1 A (32, 44)

Auch die Möglichkeiten, sich durch Artefakte täuschen zu lassen, sind zahlreich.

Von besonderer Bedeutung sind jedoch die Konzentrationen des untersuchten Antigenmaterials, das, im Gemisch, der Immunoelktrophorese unterzogen wird. Die unterste Grenze für die Darstellbarkeit lag, bei der in unseren Versuchen angewandten Mikromethode nach SCHEIDEGGER, bei $0,1 \cdot 10^{-6}$ g.

Unter den aufgezählten Vorbehalten wurden die Ergebnisse der Immunoelktrophorese-Versuche auch im Detail betrachtet, das heißt, in den Fällen, in denen eines der sonst regelmäßig erscheinenden Präzipitate fehlte. Auffallenderweise waren hier nur solche Proteine anzuführen, die bekanntlich relativ niedrige Serumkonzentrationen aufweisen. In den 54

Versuchsreihen fehlte das hochmolekulare α_2 -Makroglobulin in zwei, das langsamwandernde Lipoprotein in vier Blasenpherogrammen, β_1 A dagegen in sechs Blasen- und vier Serumpherogrammen. Ein negativer Befund war somit bei den Blasen weitaus häufiger, und, bis auf eine Ausnahme, nur bei hämorrhagischen anzutreffen. Da die zu den Versuchen verwendeten Probenmengen als konstant anzusehen waren, lag der Gedanke nahe, daß die zusätzliche Beimengung an Blut bei den hämorrhagischen Blasenflüssigkeiten die absolute Konzentration der übrigen Serumproteine etwas herabsetzte.

Das Vorhandensein oder Fehlen von IgA bedurfte wohl keiner Wertung, da es über die gesamte Versuchsreihe besonders unregelmäßig verteilt war. Mit 112 mg% im Serum lag es, unter den vorliegenden Versuchsbedingungen, anscheinend gerade an der Grenze zur Darstellbarkeit, so wie auch Präalbumin, α_1 -saures Glykoprotein, Coeruloplasmin, die Gc-Globuline und die β -Glykoproteide im Pherogramm infolge ihrer geringen Konzentrationen fehlten. Dieselbe Vermutung findet sich bei POTTER und MERRIL (54).

Signifikante Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten zwischen Serum- und Blasenproteinen, so wie HERRMANN und SCHULZ (19) sie mitgeteilt haben, konnten in unseren Präparaten nicht festgestellt werden. Auch ein dort (19) beschriebenes Merkmal im Präparat einer mit flüssigem Stickstoff erzeugten Blase, das darin bestand, daß die α_1 -Lipoprotein-Linie in einen kontinuierlichen Bogen in die des α_2 -Globulins übergegangen war, kam in keinem unserer Blasenpherogramme zur Wiederholung.

Wenn man der Immunoelktrophorese eine quantitative Aussage entnehmen durfte, was nur unter Vorbehalt geschehen soll (26), so zeigte sich im Hinblick auf die Albuminfraktion, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (16, 57), ein neutraler Befund im Vergleich zwischen Serum- und Blasenpherogramm. Beobachtungen in der Richtung, daß die Albuminfraktion in der Blasenflüssigkeit erhöht sei (5, 34, 35, 71), konnten hierbei nicht gemacht werden. Dies dürfte wohl auf die unterschiedliche Genese der Blasen zurückzuführen sein, so bei MATRAS und STÖBERL (40) Pemphigus- und Brandblase.

Die Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese:

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen Blasenflüssigkeit und Serum desselben Probanden, zeigten auch bei den Versuchen mit der PAA-Disc-Elektrophorese eine weitgehende Übereinstimmung der Proteinmuster im Spektrum. Unter Berücksichtigung der Laufstrecke konnten, entsprechend den Ergebnissen der immunologischen Identifizierung von wasserlöslichen Proteinen im Serum (11), die wichtigsten Fraktionen und Linien bezeichnet und die Seren den Blasen vergleichend gegenübergestellt werden. Dabei ließ sich die Identität zwischen den wichtigsten Proteinen bzw. Fraktionen wie

α_1 -Glykoprotein,

Fraktion II mit α_1 -Antitrypsin, Präalbumin und Albumin,
Transferrin,

β_1 A,

Haptoglobulin,

α_2 -Makroglobulin und

β -Lipoprotein

erkennen. Da die eigenen und andere immuno-elektrophoretische Untersuchungen (19) schon ergeben haben, daß die Proteine des Blaseninhaltes nicht nur elektrophoretisch, sondern auch in ihren antigenen Eigenschaften mit denen des Serums identisch sein müssen, durfte nun von den sich entsprechenden Banden der Blasen- und Serumspektren wohl behauptet werden, daß es sich hierbei um Proteine gleicher Herkunft handelte.

Eine anschließend grob quantitative Auswertung erfolgte durch einfaches Durchnummerieren der Banden in jedem Pherogramm und Ermittlung der Durchschnittszahlen daraus. Dies ergab, bei den im Versuch auf gleiche Endeiweißkonzentration gebrachten Untersuchungsmaterialien keine besonderen Differenzen. Das leichte Überwiegen der Durchschnittszahl bei den Seren mit 14,9 (Max. 20, Min. 11) gegenüber der bei den Blasen mit 13,6 (Max. 18, Min. 10) durfte bei 28 Präparaten wohl nicht überbewertet werden, noch dazu wenn man berücksichtigte, daß gerade das Auftreten der schwächeren Linien bei der PAA-Disc-Elektrophorese stärker variierte und manchmal in Zahlen schwer festzuhalten war.

Eine Gegenüberstellung von hämorrhagischen und hellen Blasenproben ergab die sich annähernden Werte von 13,6 (hämorrhagisch) und 13,5 (hell) und zeigte somit, daß sich, gleiche Eiweißkonzentrationen vorausgesetzt, die Unterschiede zwischen hämorrhagischer und heller Blasenflüssigkeit

verwischen.

Die Albuminfraktionen schienen sich, wie bei der Immunoelktrophorese, bei Blasen und Seren quantitativ zu entsprechen und zeigten auch hier keine Tendenz zu höheren Werten im Blaseninhalt. Ein quantitativer Vergleich zwischen anderen Proteinen erschien nicht sinnvoll, da es sich bei allen übrigen um wesentlich kleinere Fraktionen handelte.

Die einfache radiale Immundiffusion:

Die quantitativen Bestimmungen der Immunglobuline IgG (mit 38 Einzelwerten), IgA (mit 43 Einzelwerten) und IgM (mit 36 Einzelwerten), sowie β_1 A (mit 37 Einzelwerten) im Serum und im Blaseninhalt gaben zusätzlich Aufschluß über deren Durchtrittseigenschaften durch die Kapillarmembran im Bereich einer Blasengrundfläche.

Da die untersuchten Einzelkollektive recht klein waren, durften die statistischen Zahlen nur als Annäherungswerte angesehen werden, auch wenn die Serumwerte mit denen anderer Autoren weitgehend übereinstimmten (4). So bei HEREMANS (18) für IgG 1 200 mg%, für IgA 110 mg% und für IgM 75 mg%. Bestehende Unterschiede beruhten wohl teils auf methodischen Abweichungen, teils auf Verwendung unterschiedlicher Standardseren zur Aufstellung der Eichkurven (7, 66).

In unseren Untersuchungen interessierten jedoch weniger die absoluten Werte, als vielmehr die relativen zwischen Seren und Blasen. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede im Sinne niedrigerer Blasenwerte, die für IgG mit dem Multiplizierfaktor 1,53, für IgA mit 2,3, für IgM mit 3,1 und β_1 A mit 2,2 auszugleichen waren. Diese Quotienten wurden, ohne Rücksicht auf das Geschlecht der Probanden, zwischen Seren und Blasen ermittelt. Der Tatsache, daß beim Mann die Normalwerte etwas höher liegen als bei der Frau (39), wurde durch Aufgliederung nach dem Geschlecht Rechnung getragen, erbrachte jedoch nur geringfügige Differenzen der Quotienten. So für das männliche Geschlecht für IgG und IgM 1,8 bzw. 3,6 gegenüber 1,3 bzw. 2,3 beim weiblichen Geschlecht und für IgA und β_1 A jeweils 2,2 und 2,1 in beiden Fällen.

Eine Differenzierung nach der Beschaffenheit des Blaseninhaltes ergab, daß alle vier untersuchten Proteine bei den hellen Blasenflüssigkeiten in deutlich höheren Konzentrationen vorhanden waren, als bei den blutigen, nämlich zu etwa einem Drittel. Auch hier lag wieder, wie bei der Immunoelktrophorese, der Schluß nahe, daß bei gleichen Ausgangsmengen der

Hämoglobingehalt die Konzentrationen der übrigen Proteine anteilmäßig kleiner werden läßt, ohne daß die Relationen sich ändern müßten.

Darüber, daß das Gesamteiweiß in den Blasen, gegenüber dem Proteingehalt im Serum herabgesetzt ist, herrschte schon längere Zeit Übereinstimmung (16, 24, 34, 35, 40, 57).

Interessant ist jedoch immer noch die Frage, nach welchem Prinzip diese Einengung des Substrates vorsichgeht. Inwieweit hier die Molekülgröße eine Rolle spielt, ließ sich leicht anhand der Molekulargewichte von IgG (MG 160 000), IgA (MG 150 000) und IgM (MG 960 000!) nachprüfen. Da bereits erwiesen ist (24, 72, 73), daß auch Makromoleküle die Blasengrundfläche passieren können, bleibt nur noch die Frage offen, ob dies in gleichem oder geringerem Maße geschieht als bei den niedermolekularen Eiweißen, sodaß sich die Relativwerte in der Blase anders gestalten müßten als im Serum.

Eine positive Antwort hierauf lieferten die errechneten Konzentrationsverhältnisse der Proteine IgG, IgA, IgM und β_1A untereinander und jeweils innerhalb der Serum- und Blasenflüssigkeiten. Es bestand eine Tendenz dahingehend, daß das höhermolekulare IgM im Serum zu den übrigen Proteinen in einem höheren Konzentrationsverhältnis lag als in der Blasenflüssigkeit, während sich die Verhältniszahlen der anderen Proteine zueinander weitgehend annäherten. Auch sei in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, daß von dem höhermolekularen Immunglobulin IgM sich nur etwa ein Drittel der Serumkonzentration in der Blasenflüssigkeit wiederfand, von den übrigen Proteinen jedoch immerhin die Hälfte. Solche Befunde entsprachen den bereits andernorts mitgeteilten Beobachtungen, daß bei Anwendung von Unterdruck an einer Blasengrundfläche die größten Moleküle am stärksten am Durchtritt gehindert wurden (60) und daß auch bei normalem Druck die deutliche Tendenz zu erkennen war, daß niedermolekulare Proteine die Kapillarschranken leichter passieren als Makroglobuline (5, 43, 51). Im Gegensatz dazu existieren auch andere Ergebnisse, die zeigen sollten, daß die grobdispersen und großmolekularen Blutproteine in Blase und Serum zu gleichen Proportionen vertreten seien (24) bzw. daß Übereinstimmung in den einzelnen Fraktionen auch quantitativ bestünde (16, 51).

Könnte man nun die gesetzmäßigen Zahlenzusammenhänge zwischen Serum- und Blasenwerten in genügend großen Versuchsreihen statistisch ermitteln und somit einen allgemein gültigen Umrechnungsindex finden, wäre man

praktisch in der Lage, bei Unmöglichkeit einer Venenpunktion aus der klinischen Bewertung des Blaseninhaltes Rückschlüsse auf das Serum des Patienten zu ziehen.

E.) ZUSAMMENFASSUNG

Die qualitativen und quantitativen Beziehungen zwischen artifiziell entstandenen Blasen und dem Serum desselben Probanden, wurden mit Hilfe der Immunoelktrophorese, der Polyacrylamidgel-Disc-Elektrophorese und der einfachen radialen Immundiffusion beleuchtet.

Die Immunoelktrophorese ergab, daß die wichtigsten Präzipitate des Serums auch in der Blasenflüssigkeit anzutreffen waren und nicht nur die elektrophoretische Beweglichkeit, sondern auch die antigenen Eigenschaften der untersuchten Proteine übereinstimmten, was auf gleiche Herkunft schließen ließ. Das Fehlen eines Präzipitates erklärte sich durch die niedrige Konzentration des betreffenden Proteins im Probenmaterial und, da fast nur bei Blasen zu beobachten, lag die Folgerung nahe, daß die Eiweißkonzentration in der Blasenflüssigkeit etwas niedriger lag als im Serum.

Die PAA-Disc-Elektrophorese zeigte nochmals die Übereinstimmung in der Proteinzusammensetzung, während die radiale Immundiffusion den geringeren absoluten Eiweißgehalt der Blasenflüssigkeit bestätigte und zusätzliche Aufschlüsse über die Durchtrittseigenschaften der Makromoleküle durch die Kapillarmembran im Bereich der Blasengrundfläche vermittelte. Die gewonnenen Werte sprachen für die Tendenz, daß niedermolekulare Proteine die Kapillarschranken leichter passieren als höhermolekulare.

F.) LITERATURVERZEICHNIS

- 1) ANTWEILER, H.J.: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin; Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1957).
- 2) BIEL, H. und ZWISLER, O.: Über Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel. 4. Mitteilung: Nachweis und Charakterisierung von Proteinen des menschlichen Serums mittels Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und angeschlossener Immundiffusion; Behringwerk-Mitt. 46, 141-165 (1966).
- 3) BLANEY, D.J. and MANDREA, E.: Immunoelectrophoresis of blister fluids; J.invest.Derm. 38, 53-54 (1962).
- 4) BRAUN, H.J.: Die quantitative Bestimmung der Immunglobuline; Therapiewoche 17, 1926-1928 (1967).
- 5) BREHM, G.: Zur Permeation der Serumeiweiße in die Haut und ihre quantitative Bestimmung am Modell der Cantharidenblase; Klin.Wschr. 42, 1232-1236 (1964).
- 6) BUSSARD, A. and PERRIN, D.: Electrophoresis in agar plates; J.Lab.clin. Med. 46, 689-701 (1955).
- 7) COLLINS-WILLIAMS, C., TRACHYK, S.J., TOFT, B., and MOSCARELLO, M.: Quantitative immunoglobulin levels (IgG, IgA, and IgM) in children; Int.Arch. Allergy 31, 94-103 (1967).
- 8) CREMER, H.D. und TISELIUS, A.: Elektrophorese von Eiweiß in Filterpapier; Biochem.Z. 320, 273-283 (1950).
- 9) DAVIS, B.J.: Disc-Electrophoresis II; Method and Application to Human Serums proteins; Ann.N.Y. Acad.Sci. 121, 404-427 (1964-65).
- 10) DURRUM, E.L.: A Microelectrophoretic and Microionophoretic Technique; J.Amer.Chem.Soc. 72, 2943-2948 (1950).

- 11) GEYER, E., MARGHESCU, S. und MÜLLER, J.J.: Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese; Versuche zur Isolierung und Charakterisierung von Human-Serumproteinen; *Klin. Wschr.* 14, 717-721 (1967).
- 12) GORDON, A., KEIL, B., SEBESTER, K., KNESSEL, P. und SORM, F.: Electrophoresis of proteins in agar jolly; *Coll. Trav. Chim. Tcheosl.* 15, 1 (1960).
- 13) GRABAR, P. und BURTIN, P.: Die Immunelektrophoretische Analyse; Elsevier Publishing Company, Amsterdam-London-New York (1964).
- 14) GRABER, P. und WILLIAMS, C.A. jr.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange des protéines. Application au serum sanguin; *Biochim. biophys. Acta* (Amsterdam), 10, 193-194 (1953).
- 15) GRASSMANN, W., HANNIG, K. und KNEDEL, M.: Ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier; *Dtsch. med. Wschr.*, 76, 333-336 (1951).
- 16) HAENSCH, R.: Elektrophoretische Vergleichsuntersuchungen zwischen Serum- und Bläschenflüssigkeit bei bullösen Dermatosen; *Dermat. Wschr.* 132, 1327-1330 (1955).
- 17) HARDY, W.B.: *J. Physiol.* (London), 33, 251 (1905).
- 18) HEREMANS, J.F.: Les globulines sériques du système gamma. Leur nature et leur pathologie; *Arsica*, Bruxelles und Masson, Paris (1960).
- 19) HERRMANN, W.P. und SCHULZ, K.H.: Immunelektrophoretische Untersuchungen an Blasenflüssigkeiten; *Arch. klin. exp. Derm.* 214, 493-503 (1962).
- 20) HERRMANN, W.P.: Die Immunelektrophorese und ihre Anwendung in der Dermatologie; *Arch. klin. exp. Derm.* 212, 88-99 (1960).

- 21) HERZBERG, J.J.: Vesikuläre-bullöse Erkrankungen; In GOTTRON, H.A. und SCHÖNFELD, W.: Dermatologie und Venerologie, Band II, Teil 1, S. 676-755, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1958.
- 22) HITTORF, J.W.: Poggendorfs' Ann. 89, 177 (1853).
- 23) JASINSKI, B., STIEFEL, G.E., MÄRKI, H. und WUHRMANN, F.: Über ein dem Lupus erythematodes ähnliches Zellbild im Cantharidenblaseninhalte und seine Beziehungen zu den Gamma-Globulinen; Klin. Wschr. 31, 252-256 (1953).
- 24) JASINSKI, B., STIEFEL, G.E., MARKISEN, H. und WUHRMANN, F.: Klin. Wschr. 31, 252-256 (1953).
- 25) KENDALL, J. und CRITTENDEN, E.D.: The separation of isotopes; Proc. nat. Acad. Sci. 9, 75-78 (1923).
- 26) KINDLER, U. und KOCH, D.: Die quantitative Aussage des immunoelektrophoretischen Bildes; Dtsch. med. Wschr. 95, 1152-1154 (1970).
- 27) KÖNIG, P. und KLOBUSITZKY v., D.: Beitrag zur Identifizierung von Schlangengiften für gerichtlich-medizinische Zwecke; Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 30, 156-167 (1938).
- 28) KÖRVER, G.: Elektrophorese in Filtrierpapier, ein einfaches Verfahren zur Bestimmung der Serumeiweißkörper; Klin. Wschr. 28, 693-694 (1950).
- 29) KOHLRAUSCH, F.: Über Konzentrationsverschiebungen durch Elektrolyse im Innern von Lösungen und Lösungsgemischen; Ann. Physik. 62, 209 (1897).
- 30) KOHN, J.: Zur Technik der Celluloseacetat-Elektrophorese; Ärztl. Lab. 8, 233-248 und 9, 269-278 (1964).
- 31) KRAUS, R.: Über spezifische Reaktionen in keimfreien Filtraten aus Cholera-, Typhus- und Pestbouillonkulturen, erzeugt durch homologes Serum; Wiener Klin. Wschr. 10, 736-737 (1897).

- 32) KÜHN, R.A.: Immunoэлектрофорезе-Фибел; VEB-Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1969.
- 33) KUTZIM, H.: Электрофоретическая Untersuchung von Cantharidenblaseninhalten und Blutserum; Münch.med.Wschr. 93, 2603 (1951).
- 34) LEINBROCK, A.: Veränderungen der электрофоретischen Proteinspektren im Serum und in der Blasenflüssigkeit und Verhalten der Serumlabilitätsteste bei verschiedenen Pemphigusformen; Arch.Derm.Syph. (Berl.) 192, 535-563 (1951).
- 35) LEVER, W.F.: The Proteins in Pemphigus Vulgaris; II Electrophoretic Analysis of the Proteins in the Blister Fluid of Patients with Pemphigus Vulgaris; J.invest.Derm. 14, 219-226 (1950).
- 36) LIM, S.D. und FUSARO, R.: Pemphigus vulgaris; II. An abnormal Protein of Blister Fluid and Serum Demonstrable by Immunoэлектрофорез; J.invest.Derm. 40, 173-176 (1963).
- 37) LODGE, D.: Rep., Brit., Assoc., Advance Sci.(Birmingham) 56, 389 (1886).
- 38) MANCINI, G., CARBONARA, A.O., and HEREMANS, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion; Immunochemistry, 2, 235-254 (1965).
- 39) MARGHESCU, S.: Immunglobulingehalt der normalen Haut; Arch. Derm.Forsch. 244, 283-285 (1972).
- 40) MATRAS, A. und STÖBERL, R.: Über vergleichende Электрофоретische Untersuchungen von Serum- und Blaseninhalt bei blasenbildenden Dermatosen; Derm.Wschr. 140, 828-832 (1959).
- 41) MAURER, H.R.: Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel-Электрофорез; Walter de Gruyter u. Co., Berlin 1968.

- 42) MICHAELIS, L.: Elektrische Überführung von Fermenten; I. Das Invertin; Biochem. Z. 16, 81-86 (1909).
- 43) MOULIN, G. et MANUEL, Y.: Etude immunoélectrophorétique comparative des protéines du serum et du liquide des bulles dans les dermatoses bulleuses; Ann.Derm. Syph. (Paris) 91, 505-511 (1964).
- 44) MÜLLER-EBERHARD, H.J., NILSSON, U., and ARONSSON, T.: Isolation and characterisation of two β_1 -glycoproteins of human serum; J.exp.Med. 111, 201-215 (1960).
- 45) NIEUWMEIJER, A.H.: Dermatologica, Basel 106, 379-387 (1953).
- 46) ORIOL-BOSCH, A. und VOIGT, K.D.: Über Anwendung einer Celluloseacetat-Folie für die Eiweißelektrophorese; Klin.Wschr. 37, 758 (1959).
- 47) ORNSTEIN, L. und DAVIS, B.J.: Disc-electrophoresis; reprinted by distillation products industries; Rochester, New York 1962.
- 48) ORNSTEIN, L.: Disc-electrophoresis- I. Background and theory; Ann. N.Y. Acad.Sci. 121, 321 - 349 (1964/65).
- 49) OUCHTERLONY, Ö.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis; Progr. Allergy 6, 30 (1962).
- 50) OUDIN, J.: Méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié; Compt.rend. Acad.Sci. Paris 228, 1890 (1949).
- 51) PETZOLD, F.A. und HINZ, G.: Elektrophoretische Untersuchungen der Eiweißkörper im "Gewebssaft"; Klin.Wschr. 31, 600-602 (1953).
- 52) PICTON, H. und LINDNER, S.: J. Chem.Soc. 61, 148 (1892).
- 53) PLÜCKTHUN, H. und GÖTTING, H.: Beitrag zur Methode der elektrophoretischen Untersuchung der Serumeiweißkörper auf Filtrierpapier; Klin.Wschr. 29, 415-418 (1951).

- 54) POTTER, B. and MERRILL, D.: Identification of Proteins in Vesicle Fluid; J.invest.Derm. 41, 281-288 (1963).
- 55) POULIK, M.D.: Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers; Nature 180, 1477-1479 (1957).
- 56) RAYMOND, S. und WEINTRAUB, L.S.: Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis; Science 130, 711 (1959).
- 57) RÖCKL, H. und JAROSCHKA, R.: Verhalten der Serumeiweißkörper bei Dermatosen I. Teil: Methodik (PapierELEKTROPHORESE); Arch.Derm.Syph. 194, 671-678 (1952).
- 58) SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse; Int.Arch. Allergy 7, 103-110 (1955).
- 59) SCHÖNFELD, W.: Allgemeine klinische Dermatologie; In GOTTRON, H.A. und SCHÖNFELD, W.: Dermatologie und Venerologie, Band I, Teil 2, S. 745-826, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1962.
- 60) SCHWARTZKOPF, W.: Der Einfluß von chemischen (Cantharidin) und physikalischen Reizen (mechanischer Unterdruck) auf die Durchlässigkeit der Hautkapillaren des Menschen; Z.ges.exp.Med. 133, 583-594 (1960).
- 61) SCHWARTZKOPF, W.: Zur Durchlässigkeit der Capillaren im Bereich der Cantharidinblasengrundfläche; Bibl.anat. (Basel) 1, 73-80 (1961).
- 62) SCHWICK, G.: Die Technik der Immunelektrophorese; Laboratoriumsblätter, Behringwerke 1, 11 (1958).
- 63) SCHWICK, G. und STÖRIKO, K.: Qualitative und quantitative Plasma-proteinbestimmung durch Immunpräzipitation; Laboratoriumsblätter der Behringwerke, Mai 1964.
- 64) SMITHIES, O.: Zone Electrophoresis in Starch Gels: Group Variations in the Serum Proteins of normal Human Adults; Biochem. J. 61, 629-641 (1955).

- 65) STEIGLEDER, G.K.: Allgemeine Pathologie der Haut; In GOTTRON, H.A. und SCHÖNFELD, W.: Dermatologie und Venerologie, Band I, Teil 1, S. 253-327, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart 1961.
- 66) STÖRIKO, K.: Normal values for 23 different human plasma proteins determined by single radial immunodiffusion; Communication 6th Int. Congr. Clin. Path., Rome 1966.
- 67) SVEDBERG, Th. und SCOTT, N.D.: J. Amer. Chem. Soc. 46, 2700 (1924).
- 68) SYNGE, R.L.M. und TISELIUS, A.: Fractionation of hydrolysis products of amylose by electrokinetic ultrafiltration in an agar-agar jelly; Biochem. J.-Proc. Biochem. Soc. 46, XLI-XLII (1950).
- 69) TISELIUS, A.: Electrophoresis of purified antibody preparations; J. exp. Med. 65, 641 (1937). Ein neuer Apparat für die elektrophoretische Analyse von Kolloidmischungen; Trans. Farad. Soc. 33, 524 (1937).
- 70) TURBA, F. und ENENKEL, A.J.: Elektrophorese von Proteinen in Filtrierpapier; Naturwissenschaften 37, 93 (1950).
- 71) WÜNSCHE, H.W.: Das Eiweiß in der Cantharidenblase beim Gesunden und beim Lungentuberkulösen; Klin. Wschr. 31, 170-173 (1953).
- 72) WUHRMANN, F.: Einige aktuelle klinische Probleme über die Serum-Globuline; Schweiz. med. Wschr. 82, 937-940 (1952).
- 73) WUHRMANN, F. und WUNDERLY: Die Eiweißkörper des Menschen; Basel 1952.
- 74) WORLD HEALTH ORGANIZATION: Nomenclature for human immunoglobulins; Bull. Wd. Hlth. Org. 30, 29-30 (1964).
- 75) ZELGER, J. und HOCHLEITNER, H.: Thermische und elektrische Schädigungen der Haut; In GOTTRON, H.A. und SCHÖNFELD, W.: Dermatologie und Venerologie Band III, Teil 1, S. 70-83, Georg Thieme-Ver-

lag, Stuttgart 1959.

- 76) ZWISLER, O. und BIEL, H.: Über Elektrophorese in horizontalem Polyacrylamid-Gel. 3. Mitteilung: Die Kombination von Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und Immundiffusion; Behringwerk-Mitt. 46, 129-139 (1966).

Ich danke Herrn Professor Marghescu für die Über-
lassung des Themas, sowie für sein stetiges Interesse
am Fortang der Arbeit und seine wertvollen Anregun-
gen.

LEBENS LAUF

Geboren wurde ich am 26. Mai 1947 als 2. Tochter des Volksschullehrers Peter Falkenberg und seiner Ehefrau Anni, geb. Englmann, in Frauenthal, Kreis Euskirchen.

1953 trat ich in die Volksschule in Lechenich ein; 1954 verstarb mein Vater; 1957 wechselte ich in die Höhere Schule in Lechenich. 1960 zog meine Mutter nach München, wo ich dann bis 1966 das Theodolinden-Realgymnasium besuchte, und mit dem Abitur abschloß.

1966 begann ich an der Ludwig Maximilians-Universität das Studium der Zahnheilkunde, das ich 1972 mit dem Staatsexamen beendete.

Mein erstes Arbeitsverhältnis als Assistentin in einer zahnärztlichen Praxis, begann ich im Januar 1973 in Scheyern, Kreis Pfaffenhofen. Dort heiratete ich am 9.2.73 den Medizinalassistenten Dr. Werner Gebhart. Wegen seiner Einberufung zur Bundeswehr verzogen wir im November 1973 nach Großkarolinenfeld bei Rosenheim. Eine neue Arbeitsstelle fand ich ab Dezember 1973 in Bad Aibling.

